Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken
und der Abteilung Pharmakologie des Institutes für
Veterinär-Pharmakologie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Helmut Kewitz

Enterale Resorption, Verteilung und Ausscheidung von Formaldehyd bei Ratten und Mäusen

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät
der
Freien Universität
Berlin

vorgelegt von

Klaus Udo Kuschinsky

aus ~~Wiesbaden~~
Berlin

1965

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität
Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken
und
der Abteilung Pharmakologie des Institutes für Veterinär-Pharmakologie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Helmut Kewitz

Enterale Resorption, Verteilung und Ausscheidung von Formaldehyd bei Ratten und Mäusen

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin
vorgelegt von

Klaus Udo Kuschinsky
aus ~~Wiesbaden~~
Berlin

Dekan: Professor Dr.med. Adalbert L o e s c h k e
Referent: Professor Dr.med. Helmut K e w i t z
Korreferent: Professor Dr.med. Hans H e r k e n

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 28. Mai 1965

INHALTSVERZEICHNIS Seite

EINLEITUNG 5

METHODIK 7

A. Versuchstiere 7
B. Substanzen 7
C. Applikation 7
D. Autoradiographie von Ganztierschnitten 8
E. Quantitative Zählung der Radioaktivität 1o
a. Messung der C-14-Aktivität von Bariumcarbonat 1o
b. Messung der C-14-Aktivität im Harn 11
c. Messung der Aktivität in den Faeces 11
d. Bestimmung von C-14 im Tierkörper 11
e. Bestimmung der Aktivität in den einzelnen Organen 12
f. Berechnung der Zerfälle pro Minute (Tpm) 12

ERGEBNISSE 13

I. Ausscheidung von C-14 nach oraler Applikation von markiertem Formaldehyd 14
A. Ausscheidung durch Exhalation 15
a) Exhalation von Formaldehyd 15
b) Ausatmung von $^{14}CO_2$ 19
B. Ausscheidung von C-14 im Harn 23
C. Ausscheidung von C-14 mit dem Kot 24
D. Bestimmung des im Tier verbliebenen C-14 26

II. Verteilung von C-14 im Tierkörper nach oraler Applikation von C-14-markiertem Formaldehyd 28
A. Autoradiographische Befunde 28
a. Verteilung der Radioaktivität zu verschiedenen Zeiten nach der Applikation 29

Seite

b. Einzelheiten der Organ- und Gewebe-Verteilung 43

B. Messung der Radioaktivität in Gewebshomogenaten 57

III. Fraktionierung der radioaktiven Bestandteile von Kot, Harn und Leber 62

a. Fraktionierung der radioaktiven Kotbestandteile 63

b. Fraktionierung der radioaktiven Harnbestandteile 64

c. Fraktionierung der radioaktiven Bestandteile in der Leber 65

DISKUSSION 68

ZUSAMMENFASSUNG 77

LITERATUR 79

EINLEITUNG

Formaldehyd oder Verbindungen, aus denen Formaldehyd freigesetzt werden kann, werden zur Nahrungsmittelkonservierung verwendet. Deshalb ist es notwendig zu wissen, wie sich dieser Stoff im Tierkörper verhält. Die Anwendung erfolgt auf verschiedene Weise, z.B. werden Eier direkt mit Formaldehyddämpfen behandelt. Beim Räuchern soll die haltbarkeitssteigernde Wirkung zumindest teilweise auf der Entstehung von Formaldehyd beruhen. Zur Konservierung verschiedener Fischzubereitungen oder anderer Meeresprodukte dient sehr häufig Hexamethylentetramin, aus dem unter bestimmten Bedingungen Formaldehyd abgegeben wird.

Gegen jede Art des Zusatzes dieser ausserordentlich reaktionsfähigen Substanz zu Lebensmitteln sind Bedenken vorgebracht worden, weil auf Grund von Experimenten an Drosophila (1,2) auch beim Menschen mutagene Wirkungen und auf Grund von Untersuchungen an der Ratte cancerogene Wirkungen (3) befürchtet werden. Ein sicheres Urteil über die Gefährdung der Konsumenten liess sich bisher jedoch nicht abgeben. Voraussetzung für jede Art einer schädlichen Wirkung ist selbstverständlich die Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt, die zwar von früheren Untersuchern wie McGUIGAN (4), WOLF (5,6) und SCHASSAN (7) gefunden wurde, die aber in einer neueren Publikation von MALORNY (8) nachdrücklich angezweifelt wird. Deshalb war eine eindeutige Klärung dieser Frage dringend erforderlich.

Dazu erschien die Verwendung von Formaldehyd, der mit C-14 markiert ist, am besten geeignet. Dieses Verfahren gestattet gleichzeitig Untersuchungen über die Verteilung und die Ausscheidung des als Formaldehyd oral zugeführten Kohlenstoffs.

METHODIK

A. Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Albinoratten im Gewicht von ca. 125 g und Albinomäuse beiderlei Geschlechts, im Gewicht von 16 - 3o g, verwendet.

B. Substanzen

Formaldehyd stand in Form der handelsüblichen 38 Vol %igen Lösung zur Verfügung, aus der geeignete Verdünnungen hergestellt wurden.

C-14-markiertes Paraform des RADIOCHEMICAL CENTRE in Amersham mit einer spezifischen Aktivität von 86,3 µC/mg = 191,6 . $1o^6$ Tpm/mg wurde nach Anweisung des Herstellers 2 Stunden bei 2 atü im Autoklaven depolymerisiert. Die dadurch erhaltene 1%ige $H^{14}CHO$-Lösung diente als Stammlösung, die kurz vor der Anwendung 1 : 5 oder 1 : 1o mit o,9%iger NaCl-Lösung verdünnt werden konnte.

C. Applikation

Die Formaldehydlösungen wurden mit einer Record-Spritze durch eine Sonde in den Magen der Tiere appliziert. Zur Ermittlung der Gesamtaktivität, die ein Versuchstier erhielt, wurde ein aliquoter Teil der oral verabreichten radioaktiven Lösung mit einer geeigneten Mikropipette abgenommen, verdünnt und im Scintillationszähler "TRI-CARB" der Firma Packard gemessen. Die Berechnung der Zählausbeute erfolgte nach Zugabe von C-14-Toluol mit bekannter Radioaktivität.

D. Autoradiographie von Ganztierschnitten nach ULLBERG (9)
Die Versuchstiere (Mäuse oder Ratten) wurden 5 Minuten bis 4 Tage nach oraler Gabe von C-14 Formaldehyd mit Äther narkotisiert und dann in gestreckter Position in einer Kältemischung eingefroren, die mit Hilfe von fester Kohlensäure und Aceton hergestellt worden war. Bei -12 bis -14°C im Kühlraum erfolgte die Einbettung des ganzen Tieres in Carboxymethylcellulose, nachdem die distalen Extremitätenteile abgeschnitten waren. Die Tiere lagen mit der rechten Körperseite auf einer Platte (s.Abb. 1a), die auf dem Mikrotom der Firma Jung festgeschraubt werden konnte. Die Längsachse des Schneidemessers stand beim Schneiden zu der des Tieres in einem Winkel von ca. 45°. Nach Abhobeln der obersten Schichten des Präparates folgten Schnitte der gewünschten Dicke von 3o - 1oo µ, die auf "TESA-FILM"-Klebestreifen aufgezogen waren, indem diese vor dem Schneiden auf die Schnittfläche geklebt wurden. Die Schnitte lagerten zum Trocknen 48 Std. offen im Kühlraum und wurden danach mit Glasplatten zugedeckt (s.Abb. 1b). Zur Autoradiographie wurden die Schnitte in der Dunkelkammer bei schwachem Rotlicht von der Glasplatte abgenommen und auf Filmstreifen von entsprechender Grösse aufgeklebt (s.Abb. 1c). Unter den Film mit dem aufgeklebten Schnitt kam eine Pappunterlage und darüber ein Schaumgummikissen. In dieser Reihenfolge: Schaumgummikissen, Film mit aufgeklebtem Schnitt, Pappkarton, Film u.s.w. wurden zahlreiche Schnitte übereinandergeschichtet und zwischen zwei Kunststoffplatten komprimiert, damit

bei der Exposition Film und Schnitt überall gut Kontakt hatten (s.Abb. 1d).

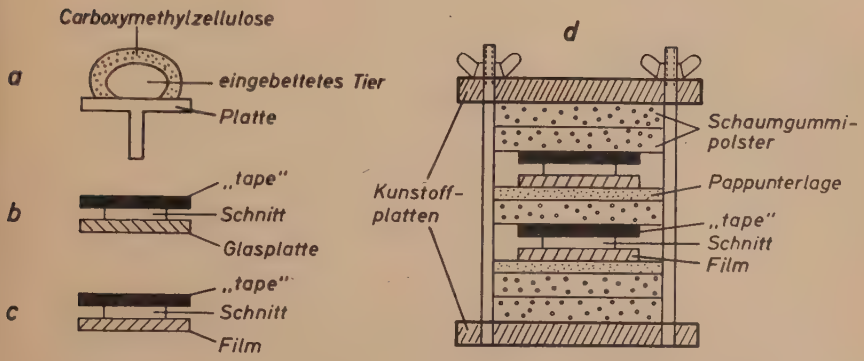

Abb. 1: Methodik der Autoradiographie
a) Zur Autoradiographie vorbereitetes Tier
b) Aufbewahrung der Schnitte
c) und d) Exposition der Filme

Als Filmmaterial diente Mikrotest 1, 2 und 3 der Firma Schleussner. Die Expositionszeit betrug je nach der C-14-Konzentration 12 - 58 Tage. Sie wurde im voraus ermittelt, auf Grund von Proben mit einem sehr empfindlichen, aber grobkörnigen, daher schlecht auflösenden Röntgenfilm. Nach Beendigung der obengenannten Expositionszeiten wurden die Schnitte von den Filmen abgenommen und die Filme 5 Minuten im Entwickler Gaevert G 15o entwickelt, dann fixiert, 1 Std. lang gewässert und nach dem Trocknen in Zellophan-Couverts aufbewahrt.

E. Quantitative Zählung der Radioaktivität

Die Ermittlung der C-14-Aktivität in den Proben erfolgte im Scintillationszähler "TRI-CARB" (Liquid Scintillation Counting System Model 314 Ex) der Firma Packard. Das Energiespektrum der einfallenden Impulse war nach unten durch die Potentiometereinstellung 8o und nach oben durch die Einstellung 1ooo limitiert. Die Spannung an dem Elektronenvervielfacher betrug ca 85o V. o,1 ml wässriger Lösungen wurden im Zählglas mit 1o ml einer Lösung von 4 g PPO und 5o mg Dimethyl-POPOP je Liter Toluol p.a. mit 2o% Äthanol p.a. vermischt (Scintillatortoluol mit Äthanol). Die Zählung wässriger, inhomogener Lösungen erfolgte nach zusätzlicher Mischung mit ca. 5oo mg CAB-O-SIL (thixotropes Gel der Firma Packard). CAB-O-SIL stabilisiert die Suspension und verhindert die Entmischung. Bei Proben lipophiler, homogener Lösungen unterblieb der Äthanolzusatz zum Scintillatortoluol. Bei lipophilen nicht homogenen Lösungen wurden ebenfalls 5oo mg CAB-O-SIL je Zählglas verwendet. Von der Bruttoimpulszahl wurde der jeweils ermittelte Nullwert abgezogen. Die Berechnung der Zählausbeute erfolgte nach Zugabe von C-14-Toluol mit bekannter Radioaktivität. Sie betrug in der Regel 6o - 7o %.

a. Messung der C-14-Aktivität von Bariumcarbonat

Das in Waschflaschen aufgefangene Bariumcarbonat wurde, jede Fraktion getrennt, durch 1 G 4 - Glasfiltertigel filtriert, bei ca 15o°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Von jeder Fraktion wurden in der Regel 3 aliquote Teile von 1-1o mg zu Parallelbestimmungen der Radioaktivität in Scintillatortoluol unter Zusatz von CAB-O-SIL suspendiert.

b. Messung der C-14-Aktivität im Harn

Nach Feststellung des Volumens wurde der Harn mit H_2O so weit verdünnt, dass bei Verwendung von o,1 ml passende Impulsraten gemessen wurden. 3-fache Parallelbestimmungen von jeder Harnfraktion erfolgten in Scintillatortoluol mit Äthanol.

c. Messung der Aktivität in den Faeces

3 gleiche Proben jeder mit Wasser homogenisierten Kotfraktion wurden in trockene Zählgläser eingewogen und unter Verwendung von CAB-O-SIL in Scintillatortoluol mit Äthanol aufgeschwemmt.

d. Bestimmung von C-14 im Tierkörper

24, 48 oder 96 Stunden nach der oralen Gabe wurden die Mäuse mit Äther getötet, zerstückelt und jede Maus einzeln nach der von REMMER (11) angegebenen Methode mit etwa der 4-fachen Menge H_2O im Starmix 5 Min. homogenisiert. Mit Hilfe eines feinmaschigen Küchensiebes wurde das Homogenat von groben Bestandteilen befreit und dann sein Volumen festgestellt. Die abgesiebten Bestandteile wie Knochen, Haare und Schwanzsehnen konnten durch 1-stündiges Kochen mit 1o ml 2o % KOH zum grössten Teil gelöst werden. Vorher war sichergestellt worden, dass C-14 nicht in Form flüchtiger Verbindungen vorlag .Der in KOH nicht lösliche Rückstand wurde in

1o n HCl aufgelöst, diese Lösung dann mit dem KOH-Extrakt vermischt und das Volumen bestimmt. Vom Homogenat und vom vereinigten KOH- HCl-Extrakt wurden je 3 gleichartige Parallelproben im TRI-CARB unter Verwendung von 1o ml Scintillatortoluol mit Äthanol und 5oo mg CAB-O-SIL gezählt. Zum Schluss wurden die Aktivitäten im Homogenat und in der KOH-HCl-Fraktion addiert und damit die Radioaktivität in jeder Maus ermittelt.
Bei einer in gleicher Weise aufgearbeiteten Ratte wurde der C-14-Gehalt im KOH- und HCl-Extrakt getrennt bestimmt.

e. Bestimmung der Aktivität in den einzelnen Organen

Die einzelnen Organe wurden nach dem Töten und Ausbluten frisch entnommen und in gut verschliessbare Gläser eingewogen. Nach dem Homogenisieren mit einer abgemessenen Menge H_2O mit dem SERVALL OMNI-MIX erfolgten von jeder Probe 3 Parallelbestimmungen der C-14-Aktivität im TRI-CARB mit 1o ml Scintillatortoluol und 5oo mg CAB-O-SIL. Das Homogenisieren der Haut liess sich nicht so leicht durchführen. Sie musste dazu in 1o ml 2o%iger KOH-Lauge gekocht werden.

f. Berechnung der Zerfälle pro Minute (Tpm)

Jede Zählprobe wurde mit C-14-Toluol bekannter Radioaktivität versetzt und nach sorgfältiger Mischung er-

neut gemessen. Der Zusatz war so bemessen, dass die Impulsrate etwa verdoppelt wurde. Die Berechnung der Ausbeute ergibt sich aus:

$$A = \frac{(Ipm)p - (Ipm)a}{(Tpm)_{St}}$$

(Ipm)p = Nettoimpulsrate nach Zusatz der bekannten C-14-Menge

(Ipm)a = Nettoimpulsrate vor Zusatz der bekannten C-14-Menge

$(Tpm)_{St}$ = Zerfallsrate in der zugesetzten Menge C-14-Toluol.

Daraus lässt sich die Zerfallsrate (Tpm) jeder Probe berechnen nach

$$Tpm = \frac{(Ipm)a}{A}$$

ERGEBNISSE

Die erste Frage, die geklärt werden sollte, lautet: "Ist der Kohlenstoff des Formaldehyds, der über den Magen-Darm-Trakt zugeführt wird, im Blut nachzuweisen ?" Die chemische Untersuchung des Blutes auf Formaldehyd hat MALORNY bereits durchgeführt und keinen freien Formaldehyd gefunden. Als Erklärung dafür kommen 4 Möglichkeiten in Frage: 1) Der Formaldehyd könnte be-

reits mit den Inhaltsstoffen des Magen-Darm-Traktes reagiert haben und in Form einer anderen chemischen Verbindung resorbiert werden. 2) Der Formaldehyd könnte sehr rasch nach der Resorption an die Bestandteile des Blutes gebunden werden und sich deshalb dem Nachweis entziehen. 3) Der Formaldehyd könnte bereits in der Darmwand oder im Blut zu Ameisensäure und weiter zu CO_2 oxydiert oder zu Methanol reduziert werden. 4) Formaldehyd wird nicht resorbiert. In diesem Falle müsste der Kohlenstoff der aus dem Formaldehyd stammt, im Kot aufgefunden werden.

I. Ausscheidung von C-14 nach oraler Applikation von markiertem Formaldehyd

Eine Untersuchung über die Ausscheidung mit der Ausatmungsluft, mit dem Harn und mit dem Kot müsste also geeignet sein, die richtige Erklärung zu finden.

In der Ausatmungsluft können nur flüchtige Stoffe enthalten sein. Nach der oralen Applikation von C-14-markiertem Formaldehyd kommen als exhalierte, die Markierung tragende Substanzen nur der Formaldehyd selbst, seine Oxydationsprodukte Ameisensäure und Kohlensäure oder das Reduktionsprodukt Methanol in Betracht.

Falls Radioaktivität im Kot enthalten ist, könnte der C-14 entweder nicht resorbiert oder in den Darm sezerniert worden sein. Die Entscheidung darüber lässt sich aus der im Kot ermittelten Menge und mit Hilfe der Autoradiographie

an Ganztierschnitten eindeutig fällen.

Die im Harn anzutreffende Radioaktivität könnte als Bicarbonat vorliegen, wenn $^{14}CO_2$ in der Ausatmungsluft nachzuweisen ist und die beiden Ausscheidungsmaxima zur gleichen Zeit auftreten. Anderenfalls muss angenommen werden, dass das über die Niere ausgeschiedene C-14 in einer anderen, niedermolekularen Form gelöst ist, als Formaldehyd, als Ameisensäure, in eine physiologische Substanz eingebaut oder als unphysiologisches Produkt einer im Darmlumen oder im Körper erfolgten Formylierung.

Zunächst war also eine Versuchsanordnung notwendig, mit der Ausatmungsluft, Harn und Kot gleichzeitig, aber getrennt aufgefangen und die darin enthaltenen Radioaktivitäten ermittelt werden können. In der Abb. 2 ist ein Schema des gewählten Aufbaues dargestellt.

Das in einer Plexiglasröhre fixierte Tier befand sich in einem Exsiccator, durch den mit einer Wasserstrahlpumpe ein kontinuierlicher Strom gewaschener Luft gesaugt wurde. Dabei umgab der Absaugestutzen den Kopf der Ratte, so dass alle ausgeatmeten Bestandteile in nachfolgenden Waschflaschen abgetrennt werden konnten. Bei Verwendung männlicher Tiere liessen sich Harn und Kot direkt in getrennte Gefässe leiten.

A. Ausscheidung durch Exhalation

a) Exhalation von Formaldehyd

Der erste Versuch dieser Art wurde mit Formaldehyd durchgeführt, der nicht markiert war. Auf diese Weise war zu er-

mitteln, ob diese Substanz in unveränderter Form ausgeatmet wird.

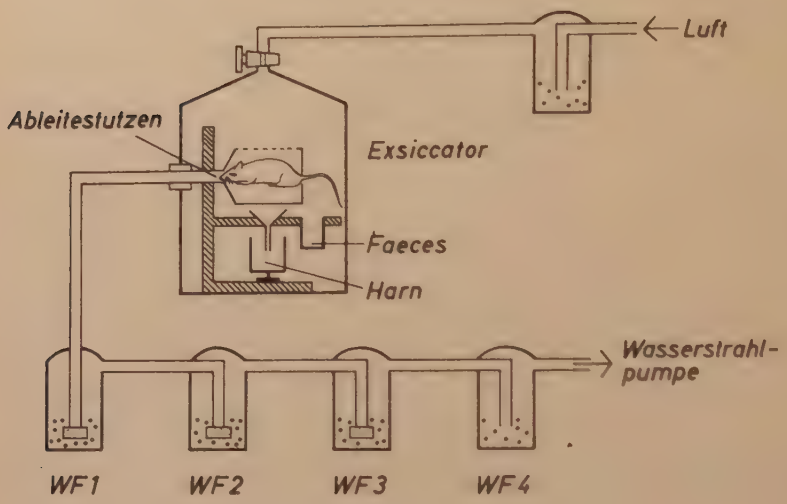

Abb. 2: Versuchsanordnung zum Auffangen von $^{14}CO_2$ der Ausatmungsluft von Harn und von Kot einer Ratte nach oraler Gabe von $H^{14}CHO$. WF = Waschflasche

Eine Ratte erhielt oral 2 ml einer o,1%igen HCHO-Lösung. Der Luftstrom von 1 l pro Minute passierte vor dem Exsiccator eine Waschflasche, in der sich zum Auffangen von Formaldehyd aus der Laborluft chromogene Säure befand. Dann kam eine 2. Waschflasche mit Wasser und erst dann der Exsiccator mit dem Versuchstier. Die aus dem Versuchsgefäss herauskommende und am Kopf des

Tieres vorbeistreichende Luft wurde ebenfalls durch eine mit chromogener Säure beschickte Waschflasche geleitet.

Formaldehyd wurde nach ANTONACOPOULOS (1o) bestimmt. Die chromogene Säure bestand aus 5oo mg Chromotropsäure in 5o ml H_2O gelöst ad 1oo,o ml 7o% H_2SO_4. Die Füllung der Waschflaschen enthielt 1 ml chromogene Säure, 1 ml H_2O und 8 ml 7o% H_2SO_4.

Der Inhalt der Waschflaschen wurde nach dem Versuch 45 Minuten lang im siedenden Wasserbad erhitzt und die Extinktion mit dem Beckman-Spektralphotometer DU bei 578 mμ gemessen. Als Eichwerte dienten Extinktionswerte von 2, 4, 6, 8 und 1o μg Formaldehyd.

	Ratte 2 ml o,1% HCHO p.o. μg HCHO	Ratte nüchtern μg HCHO	ohne Ratte μg HCHO
Laborluft	o,74	o,87	o,5o
Ratte bzw. Exsiccator	o,23	o,18	o

Tabelle 1: Formaldehyd-Bestimmung in der Luft und in der Ausatmungsluft von Ratten während 3 1/2 Std.

Tabelle 1 und Abbildung 3 zeigen die Resultate dieses Versuches. In der Laborluft ist etwas Formaldehyd vorhanden, aber die Ratte scheidet in 3 1/2 Std. keine

messbaren Mengen mit der Atmung aus. Wenn nur o,o5 % der applizierten Dosis, d.h. 1 µg exhaliert worden wäre, hätte es einwandfrei gemessen werden können. Somit ist diese Eliminationsart so unbedeutend, dass sie für die weitere Betrachtung vernachlässigt werden kann. Aus diesen Befunden ist ersichtlich, dass Formaldehyd nach oraler Gabe nicht als solches in nachweisbarer Menge ausgeatmet wird.

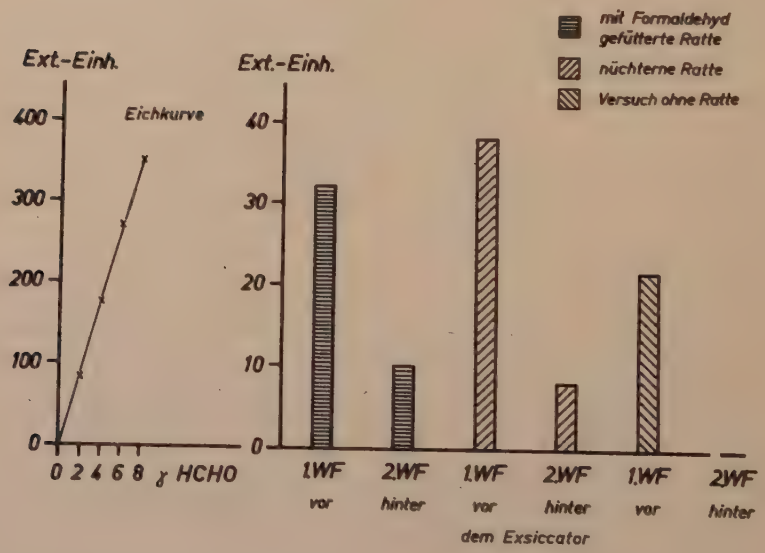

Abb. 3: Formaldehyd in der Laborluft und in der Ausatmungsluft von HCHO-gefütterten Ratten. Versuchsdauer 3 1/2 Std. 1 µg Formaldehyd = 43,5 ± 1,5 Extinktionseinheiten.

b) Ausatmung von $^{14}CO_2$:

Die jeweilige Ratte erhielt nun, bevor sie in die Apparatur gesetzt wurde, mit der Schlundsonde $H^{14}CHO$. Vor Eintritt in den Exsiccator perlte die Luft mit einer Geschwindigkeit von 1 - 2 Liter pro 5 Minuten durch eine mit H_2O beschickte Waschflasche und nach Passieren des Behälters durch 3 - 4 Waschflaschen, in denen sich 75 - 15o ml gesättigter $Ba(OH)_2$-Lösung befand. Darin wurde die gesamte Kohlensäure als $BaCO_3$ niedergeschlagen.

In der ersten Waschflasche hinter dem Exsiccator bildete sich am meisten Niederschlag, so dass sie im Abstand von 3o Minuten, spätestens nach 6o Minuten gewechselt werden musste. In der 2. Vorlage trat eine viel geringere Trübung ein. Sie brauchte nur stündlich gewechselt zu werden. Das gefällte $BaCO_3$ beider Flaschen wurde vereinigt. Die 3. und 4. Flasche enthielt nur noch sehr wenig Niederschlag. Eine Unterteilung in verschiedene Zeitabschnitte liess sich infolgedessen nicht durchführen. Für die Bilanzrechnung wurde die gesamte Menge dieser beiden Vorlagen eingesetzt. Die CO_2-Verluste beim Wechseln der Waschflaschen waren gering, denn die wenigen Handgriffe liessen sich sehr schnell verrichten und während dieser kurzen Zeit war ausserdem der Luftstrom durch das Öffnen des Systems unterbrochen.

Der Versuch wurde an 3 Ratten im Gewicht von 125 - 135 g durchgeführt. Die Tiere erhielten 12,6 mg/kg, 7,o bzw. 7,4 mg/kg, d.h. 1o9o; 6o2 und 638 µC C-14 - Formaldehyd/kg. Die Resultate sind in Abb. 4 graphisch dargestellt.

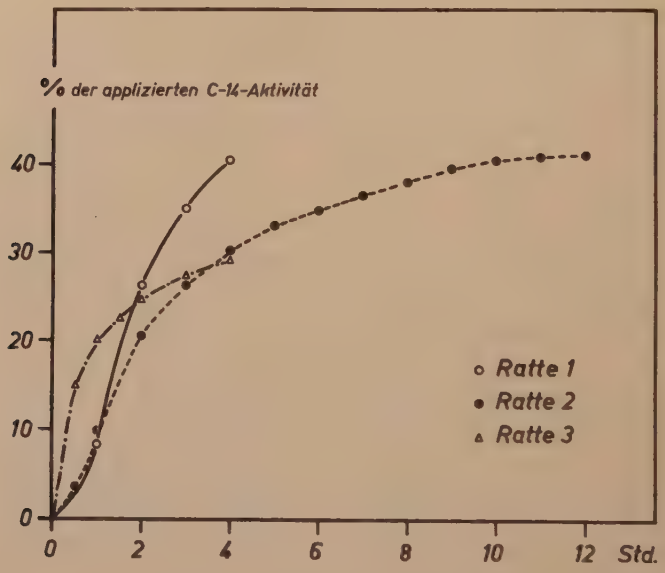

Abb. 4: Exhalation von $^{14}CO_2$ nach oraler Gabe von $H^{14}CHO$.
Ratte 1 erhielt 12,6 mg/kg, also bei 125 g Körpergewicht insgesamt 3o2 . $1o^6$ Tpm
Ratte 2 erhielt 6,98 mg/kg, also bei 135 g Körpergewicht insgesamt 181 . $1o^6$ Tpm
Ratte 3 erhielt 7,4 mg/kg, also bei 125 g Körpergewicht insgesamt 177 . $1o^6$ Tpm
Bei Ratte 1 umgab der Ableitungsstutzen der Luft aus dem Exsiccator noch nicht den Kopf des Tieres, dadurch wurde das Maximum der C-14-Ausatmung verzögert registriert.

Die Ergebnisse zeigen, dass ca. 4o % des zugeführten Formaldehyds als CO_2 exhaliert werden. Die C-14-Ausscheidung steigt im Lauf der 1. Stunde steil an und nimmt danach schnell ab, so dass dieser Eliminationsmechanismus später nicht mehr ins Gewicht fällt.

Der Nachweis, dass die C-14-Aktivität tatsächlich als $BaCO_3$ niedergeschlagen wurde und nicht in anderer Form vorlag, z.B. als Adsorbat, erfolgte mit Hilfe der Isotopenverdünnungsmethode. Dazu wurde einer abgewogenen Menge des getrockneten Niederschlages in einem gut abgedichteten Exsiccator 1-normale HCl zugesetzt. In dem Exsiccator befand sich ein Gefäss mit NaOH in fester Form, so dass das freigesetzte CO_2 während der 15-stündigen Inkubationsdauer als Na_2CO_3 gebunden wurde.

Nach Zusatz der 1o-fachen Menge von nicht markiertem Na_2CO_3 und Lösung in dem 5-fachen Volumen H_2O erfolgte die erste Fällung mit dem 3-fachen Volumen 96 % Äthanol. Dabei blieb die NaOH im Überstand und konnte von dem unlöslichen Na_2CO_3 abgegossen werden. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und mit etwas H_2O gewaschen. Nun folgten mehrfache Umkristallisationen aus Wasser, das zur vollständigen Lösung auf 4o°C erwärmt und dann zur Kristallisation in Eiswasser auf

0°C abgekühlt wurde. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte in der über dem Kristallisat stehenden gesättigten Lösung durch flammenphotometrische Messung der Na-Konzentration und Ermittlung der Impulsrate. Da das Überstehende nach jeder Kristallisation verworfen wurde, hätte die spezifische Aktivität absinken müssen, falls der C-14 in einer anderen als der Carbonatform vorgelegen hätte. Die Zahlen, die in Tabelle 2 die spezifische Aktivität angeben, streuen um einen Mittelwert mit einer Abweichung, die ± 8% nicht überschreitet. Es zeigt sich keine Abnahme des Quotienten mit zunehmender Reinheit des Kristallisates.

	Ipm/o,1 ml	µval Na/o,1 ml	$\frac{\text{Ipm}}{\text{µval Na}}$
1.Kristallisation	337 ± 26	4,58 ± 1,16	73,5
2.Kristallisation	665 ± 85	8,62 ± o,47	77,1
3.Kristallisation	13o1 ± 55	16,33 ± 1,42	79,6
4.Kristallisation	1225 ± 93	16,53 ± o,71	74,o
5.Kristallisation	769 ± 22	9,33 ± o,53	82,4
6.Kristallisation	1752 ± 159	24,6 ± 1,1	71,3

Tabelle 2: Ergebnisse der Isotopenverdünnung. Mittelwerte aus 3 Messungen ± σ.

B. Ausscheidung von C-14 im Harn

Bei 2 Tieren wurde nur die gesamte C-14-Ausscheidung mit dem Harn während der ersten 4 bzw. 12 Stunden untersucht. Bei 1 weiteren Ratte konnte durch Messung aller einzelner Harnportionen bis 48 Stunden nach der Applikation eine Eliminationskurve aufgestellt werden, die in Abb. 5 dargestellt ist.

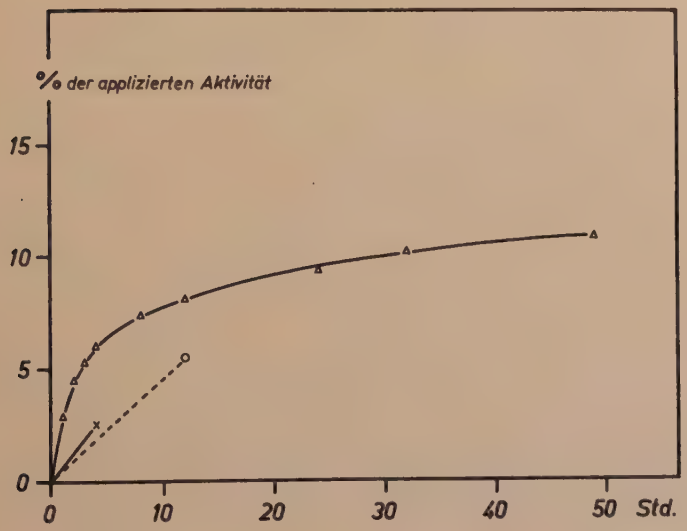

Abb. 5: Ausscheidung von C-14 im Harn von 3 Ratten nach oraler Applikation von $H^{14}CHO$.

Der Kurvenverlauf ist dem der $^{14}CO_2$ Exhalation sehr ähnlich. Die Werte betragen allerdings nur 2o% von den in der Ausatmungsluft gemessenen. Die Kurve liegt also auf einem tieferen Niveau, verläuft aber parallel zur Exhalationskurve in Abb. 4.

C. Ausscheidung von C-14 mit dem Kot

Über den Darm wurde nur sehr wenig von der applizierten Radioaktivität abgegeben. Der spontan entleerte Kot enthielt bei 2 Tieren 3 Stunden bzw. 4 Stunden nach der Verabfolgung o,o5% der eingebrachten C-14-Menge. Bei einem 3. Tier wurde innerhalb von 12 Stunden 1,5% mit dem Kot abgegeben. Im Darminhalt fanden sich die in Tabelle 3 aufgeführten Anteile.

	% der verabreichten Aktivität	
	12 Std.	48 Std.
Magen- und Dünndarminhalt	4,63	nicht gemessen
Coloninhalt	o,49	o,235

Tabelle 3

Die Elimination über den Darm dürfte also für die C-14-Ausscheidung nach oraler Aufnahme als Formaldehyd keine wesentliche Rolle spielen.

Durch die Ausscheidung über die Lunge und die Nieren werden in den ersten 12 Stunden ca. 5o% eliminiert. Der weitaus grösste Teil davon, nämlich 4/5, wird als CO_2 abgeatmet. Im Kot ist nur sehr wenig Aktivität enthalten. In den Kurven der Abb. 6 sind die Daten noch einmal zusammengefasst. Daraus muss eine rasche und vollständige Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt

gefolgert werden. Wahrscheinlich wird der Formaldehyd entweder beim Durchgang durch die Darmepithelien oder im Blut direkt zu CO_2 oxydiert (15). Jedoch gilt das nur für knapp die Hälfte des zugeführten Formaldehyds. Der andere Teil muss wesentlich langsamer eliminiert werden, das heisst er muss andere Wege des Stoffwechsels einschlagen (Abb. 6).

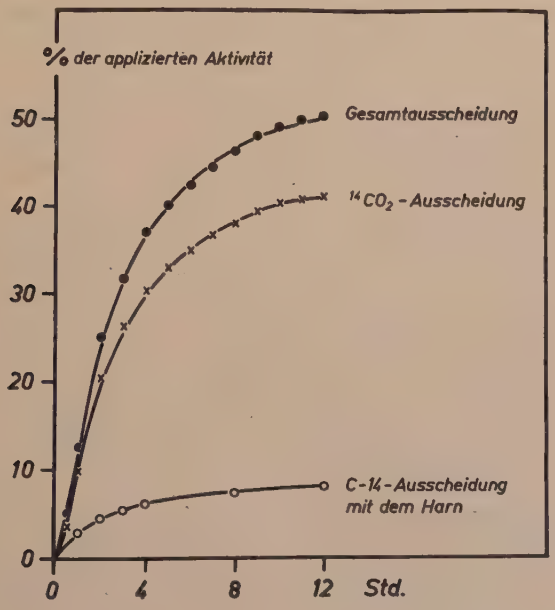

Abb. 6: Gesamtausscheidung von C-14 nach oraler Applikation von $H^{14}CHO$ an Ratten.

D. Bestimmung des im Tier verbleibenden C-14

Durch diese Untersuchungen sollte die im vorangehenden Abschnitt gezogene Schlussfolgerung, dass der anfänglichen schnell verlaufenden Eliminationsphase eine langsamer verlaufende folgt, überprüft werden. Bei 7 Mäusen und 1 Ratte wurde nach Applikation der in Tabelle 4 angegebenen Mengen untersucht, wieviel C-14 nach 24, 48 und 96 Stunden noch im Tierkörper retiniert sind. Die Resultate zeigt Abb. 7.

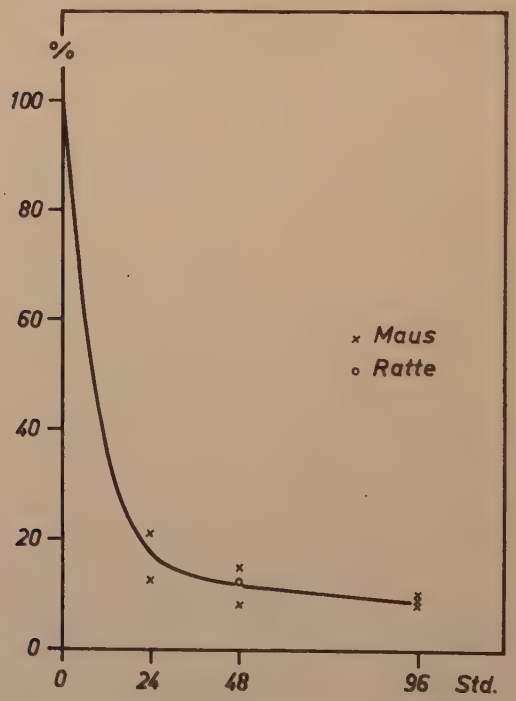

Abb. 7: Radioaktivität von Mäusen (x) und einer Ratte (o) 24, 48 und 96 Std. nach oraler Applikation von ^{14}CHOH mit einer spezifischen Aktivität von 86,3 µC/mg.

Sie stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorhergehenden Experimente. Nach Ablauf des 1. Tages nimmt die Kurve einen sehr flachen Verlauf an.

mg/kg ^{14}CHOH oral appliziert	Versuchstier	getötet nach (Stunden)
9,7	Maus	24
8,8	Maus	24
8,1	Maus	48
7,5	Maus	48
7,4	Ratte	48
8,4	Maus	96
9,2	Maus	96
1o,8	Maus	96

Tabelle 4

24 Stunden nach der oralen Gabe enthalten die Mäuse ca. 2o% der verabreichten Aktivität. Nach 4 Tagen werden noch immer fast 1o% im Organismus zurückgehalten. Weitere Anhaltspunkte über das Verhalten der radioaktiven Kohlenstoffe im Tierkörper konnten durch die im folgenden Abschnitt dargestellte Anwendung der

Autoradiographie von Ganztierschnitten nach ULLBERG gewonnen werden.

II. Verteilung von C-14 im Tierkörper nach oraler Applikation von C-14 markiertem Formaldehyd.

A. Autoradiographische Befunde.

Mit Hilfe der Autoradiographie wurde an Ganztierschnitten von Mäusen die Verteilung von C-14 auf die verschiedenen Organe und Gewebe zu verschiedenen Zeiten nach der oralen Verabreichung von C-14-Formaldehyd ermittelt. Expositionsdauer, Filmmaterial und applizierte Menge C-14 wichen bei den verschiedenen Tieren voneinander ab, so dass zwar die Intensität der Schwärzungen beim gleichen Tier, aber nicht zwischen verschiedenen Tieren direkt vergleichbar ist.

Von 6 Mäusen erhielt ein Tier durch die Schlundsonde o,o5 ml, die anderen 5 Tiere o,1 ml einer o,2%igen $H^{14}CHO$-Lösung mit einer spezifischen Aktivität von 86,3 µC/mg $H^{14}CHO$. Die Einzelheiten über Dosierung und Zeitintervalle können der Tabelle 5 entnommen werden.

Eine 26 g schwere Maus bekam o,2 ml einer o,1%igen Lösung von Formaldehyd, der nicht mit C-14 markiert war. Von diesem nach 24 Std. getöteten Tier wurden ebenfalls Schnitte angefertigt und zur Autoradiographie

verwendet- Dadurch sollte ermittelt werden, ob der mechanische Druck oder etwaige chemische Einflüsse des Formaldehyds oder seiner Reaktionsprodukte Aufhellungen des Films hervorrufen können. Das war nicht der Fall, der Film blieb unbeeinflusst.

Geschlecht	Gewicht	Appl.Radioakt. pro Tier Tpm	mg $H^{14}CHO$/kg	getötet nach
♂	17 g	29,17 . $1o^6$	8,9	5 Min.
♂	16 g	58,33 . $1o^6$	18,o	2o Min.
♂	19 g	58,33 . $1o^6$	16,o	6o Min.
♀	27 g	58,33 . $1o^6$	11,3	4 Std.
♂	3o g	58,33 . $1o^6$	1o,1	24 Std.
♂	19 g	58,33 . $1o^6$	16,o	4 Tagen

Tabelle 5

Ausserdem wurde eine Ratte untersucht. Sie wog 125 g und erhielt o,5 ml einer o,2%igen $H^{14}CHO$-Lösung. Das Tier wurde nach 4 Stunden getötet und dann genauso zur Autoradiographie geschnitten wie die Mäuse.

a) Verteilung der Radioaktivität zu verschiedenen Zeiten nach der Applikation

Der grösste Teil der Aktivität liegt nach 5 Min. wie Abb. 8 zeigt, noch im oberen Bauchraum, also im Magen und im Dünndarm. Die Überstrahlung lässt eine feinere

Lokalisation in diesem Bereich nicht zu. Jedoch ist ein Teil bereits resorbiert, denn eine geringe Aufhellung ist über allen Geweben sichtbar. Besonders deutlich treten die Konturen der Knochen hervor. Scharf und ausgeprägt markieren sich die Schädeldecke, die Schädelbasis, die Umrisse der Mandibula, die Umrisse der Wirbelkörper und die Ränder der Rippen. Die spongiösen Markräume der Knochen erscheinen zu diesem Zeitpunkt nur wenig aufgehellt. Die Speicheldrüsen am Hals und die Zungenschleimhaut heben sich deutlich von der Umgebung ab, d.h. sie enthalten mehr radioaktiven Kohlenstoff. 15 Min. später, auf Abb. 9 dargestellt, sind die Speicheldrüsen und die Schleimhäute der Zunge, des Ösophagus, des Darmes und der Blase bereits stark markiert, aber die Schädelumrisse sind nur noch an einigen Stellen zu erkennen. Der C-14 ist in die spongiösen Markräume vorgedrungen, was besonders an den Wirbelkörpern anschaulich zum Ausdruck kommt. Jetzt zeigt sich auch im Zentralnervensystem mehr Radioaktivität, als nach 5 Min. Das Hirngrau zeichnet sich deutlich von der schwächeren Aufhellung über der weissen Substanz ab. Im Bauchraum hat sich der C-14 in den Schleimhäuten des Darmes analwärts ausgebreitet. Die Leber weist eine hohe Konzentration auf. Dagegen ist der Inhalt der Blutgefässe weniger markiert, was an den grossen Gefässen inmitten der Leber besonders gut zu erkennen ist.

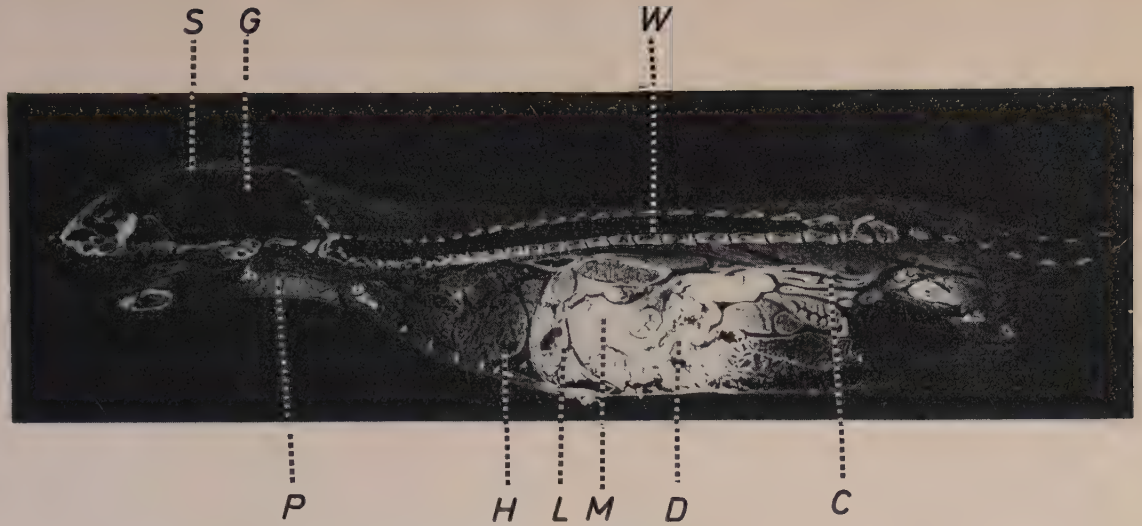

Abb. 8: Autoradiogramm eines Ganztierschnittes, Maus ♂, 17 g, getötet 5 Min. nach C-14-Formaldehyd oral: 29,17 . 10^6 Tpm ≙ 8,9 mg/kg

S = Schädelknochen	P = Gl. parotis	M = Magen
G = Gehirn	H = Herzmuskel	D = Dünndarm
W = Wirbelkörper	L = Leber	C = Colon

Abb. 9: Autoradiogramm eines Ganztierschnittes, Maus, ♂, 16 g, getötet 2o Min. nach oraler Applikation von 58,33 . $1o^6$ Tpm ≙ 18,o mg/kg C-14-Formaldehyd.

P = Gl. parotis

SU = Gl. submandibularis

B = Harnblase

Abb. 1o, ein Schnitt durch eine Maus, die 6o Min. nach Applikation getötet wurde, zeigt, dass die Radioaktivität in der Schädelkapsel sehr stark abgenommen hat und sich nicht mehr wie nach 5 Min. als ausgeprägte Hirnumrandung hervorhebt. An Stelle dessen sieht man eine Einfassung, die durch das Fehlen von C-14 hervorgerufen wird. An den Wirbelkörpern, der Mandibula und dem hier angeschnittenen Brustbein findet sich die Aufhellung vorwiegend über den Markräumen, während die corticalen Strukturen der Knochengewebe ähnlich wie am Schädel als ausgesparte Umrandungen erscheinen. Zu dieser Zeit fällt nun deutlich eine Markierung der Haut auf, die auf dem vorhergehenden Bild nur angedeutet zu sehen war.

Abb. 11 wurde von einer nach 4 Stunden getöteten Maus gewonnen. Gegenüber dem vorangehenden Bild ist nun eine stärkere Markierung der suprascapulären Fettkörper zu sehen. Aus der Corticalis der Knochen sind die letzten Reste der Radioaktivität verschwunden.

Nach 24 Stunden, in Abb. 12 dargestellt, ist eine weitere Änderung in der Verteilung aufgetreten. Über der Muskulatur, die sich nach 4 Stunden noch nicht abhob, zeigt sich jetzt eine Aufhellung, und besonders das Myocard, das bis dahin gegenüber dem Blut nicht hervortrat, ist deutlich markiert.

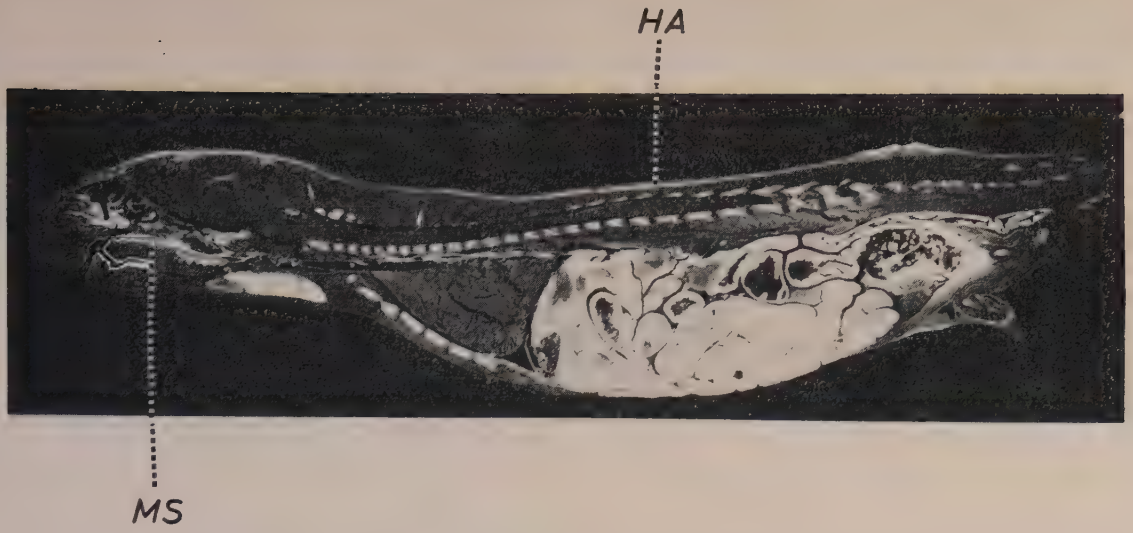

Abb. 1o: Autoradiogramm eines Ganztierschnittes, Maus, ♂, 19 g, getötet 6o Min. nach oraler Applikation von 58,33 . $1o^6$ Tpm ≙ 16,o mg/kg C-14-Formaldehyd.
MS = Mundschleimhaut
HA = Haut

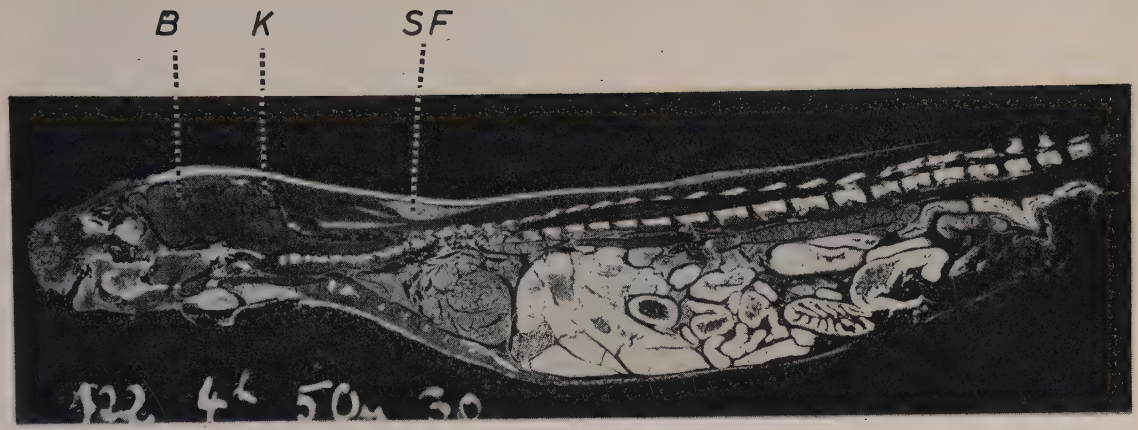

Abb. 11: Autoradiogramm eines Ganztierschnittes, Maus, ♀, 27 g, getötet 4 Std. nach oraler Applikation von $58{,}33 \cdot 10^6$ Tpm ≙ 11,3 mg/kg C-14-Formaldehyd

B = Balken

K = Kleinhirn

SF = Suprascapulärer Fettkörper

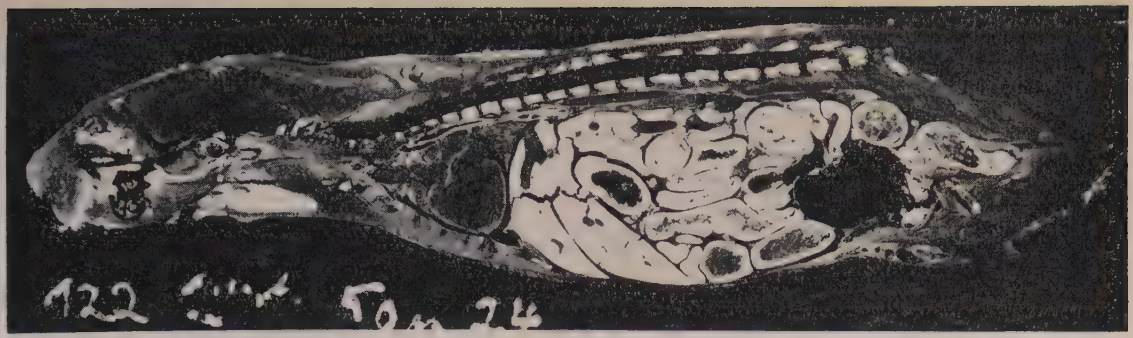

Abb. 12: Autoradiogramm eines Ganztierschnittes, Maus, ♂, 3o g, getötet 24 Std. nach Applikation von 58,33 . $1o^6$ Tpm ≙ 1o,1 mg/kg C-14-Formaldehyd.

Nach 4 Tagen, auf Abb. 13, sind die Einlagerungen von C-14 in die Muskulatur im Vergleich zu den anderen Geweben noch stärker geworden. Der Herzmuskel imponiert als kräftiger Ring, die Brust- und Bauchmuskulatur, die vorher nur schwach dargestellt waren, treten deutlich hervor. Sogar das Zwerchfell ist einwandfrei zu erkennen. Bei den Schleimhäuten des Verdauungstraktes ist der Fundusanteil des Magens besonders hervorgehoben. Von den anderen Organen des Bauchraumes enthält die Nebennierenrinde am meisten C-14.

Etwas weniger findet sich in der Niere und in der Leber. Die Aufhellungen über dem Knochenmark, den Speicheldrüsen und dem suprascapulären Fettkörper haben zwar abgenommen, sind aber in ihren Relationen unverändert. Der Markierungssaum in der Haut hat sich, wenn man ihn mit dem auf Bild 11 vergleicht, nach auswärts verschoben.

Im Vergleich zu anderen Geweben hat die Markierung aber auch im Gehirn zugenommen, wo vorwiegend die graue Substanz betroffen ist, in der aber manche Abschnitte mehr C-14 enthalten als andere. Im Hippocampus setzt sich z.B. deutlich eine stärker aufgehellte Zone ab.

b) Einzelheiten der Organ- und Gewebe-Verteilung

Im gesamten Magen-Darm-Trakt fällt auf, dass die Radioaktivität zu allen Zeiten in relativ hoher Kon-

zentration in der Schleimhaut vorhanden ist, während die darunter gelegenen Wandschichten nur sehr wenig enthalten. Das ist gut auf Abb. 14 zu erkennen, die eine Vergrösserung eines Autoradiogrammes vom Bauchraum einer Ratte dargestellt, die 4 Stunden nach der Verabfolgung des markierten Formaldehyds getötet wurde. Von der Magenschleimhaut erscheint besonders am 4. Tag die Pars pylorica stärker markiert als die Pars cardiaca. Die unscharfe Begrenzung der Aufhellung über der Magenwand könnte dadurch bedingt sein, dass ein Teil der Aktivität im Schleim enthalten ist. Ob eine Sekretion radioaktiven Materials in der Magenschleimhaut stattfindet, ist aus den Abbildungen nicht zu entnehmen, wäre aber durchaus denkbar. In den Speicheldrüsen findet sich während der gesamten Beobachtungszeit relativ viel C-14. Dabei fällt auf, dass nach 4 Tagen in der Parotis mehr Radioaktivität vorliegt, als in der Sublingualis und der Submandibularis, obwohl diese 3 Drüsen bei der Maus gleichartig aufgebaut sind.

Auf dem bereits erwähnten Schnitt, in Abb. 14 sind auch an anderen Organen interessante Einzelheiten zu erkennen. Es sieht so aus, als entspräche in der Leber die Aktivitätsverteilung dem Läppchenaufbau. Um die Zentralvene ist der C-14 stärker angereichert als in der Läppchenperipherie. Eine sichere Aussage darüber wäre allerdings erst nach der Autoradiographie

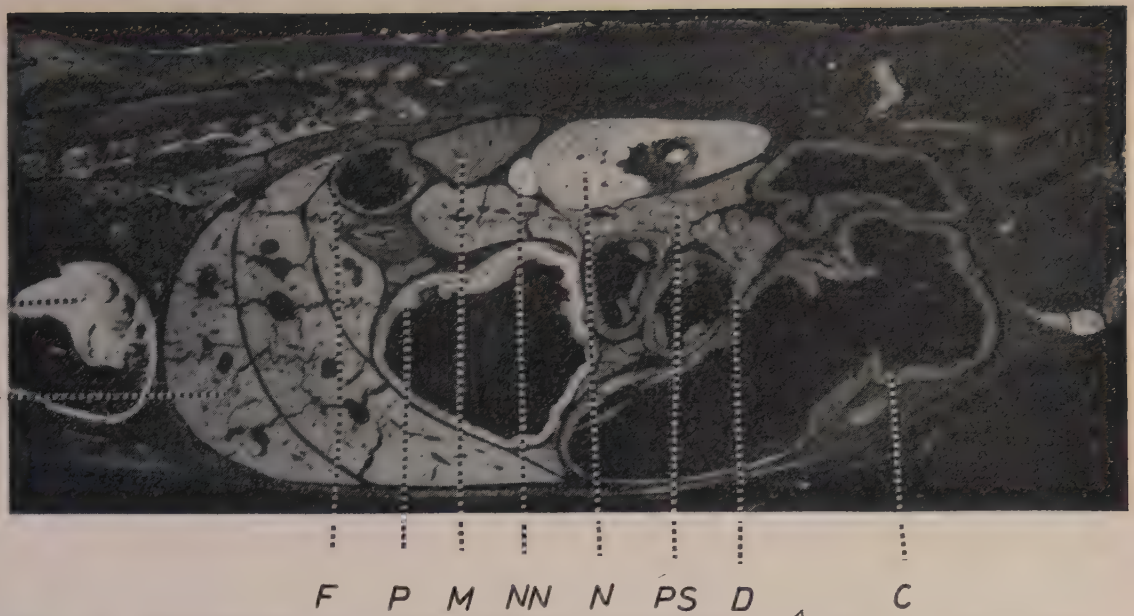

Abb. 13: Ausschnitt aus einem Schnitt einer Maus, ♂, 19 g, 4 Tage nach oraler Applikation von $58{,}33 \cdot 10^6$ Tpm ≙ 16,0 mg/kg C-14-Formaldehyd.

M = Milz	L = Leber
NN = Nebenniere	F = Magen, Fundusteil
N = Niere	P = Magen, Pylorusteil
PS = Pankreas	D = Dünndarm
H = Herzmuskel	C = Colon

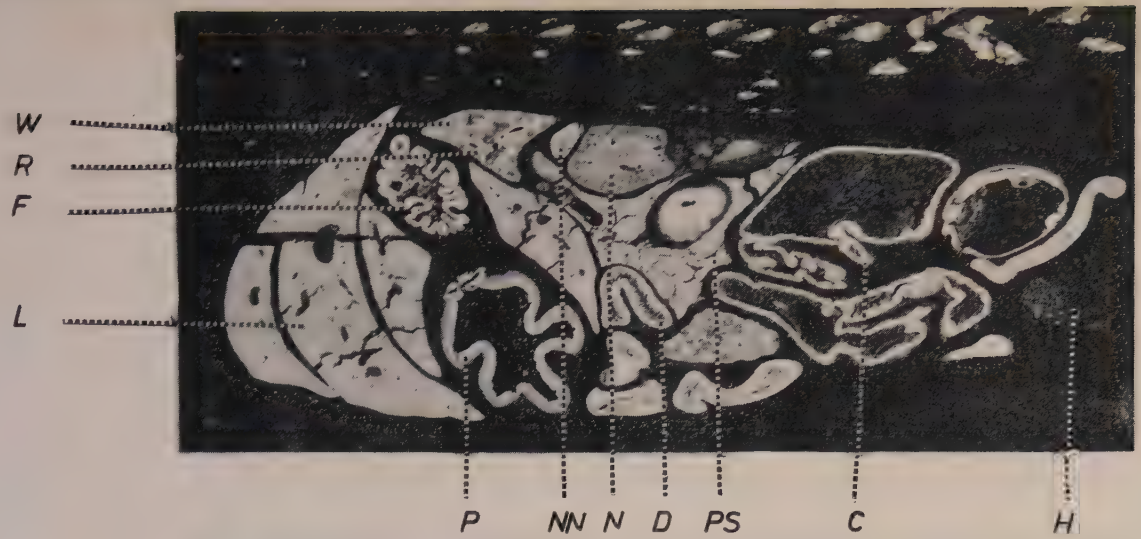

Abb. 14: Ausschnitt aus dem Schnitt von einer Ratte, 4 Std. nach oraler Applikation von 3o2,5 . 10^6 Tpm ≙ 12,6 mg/kg C-14-Formaldehyd.

W = Milz, weisse Pulpa
R = Milz, rote Pulpa
NN = Nebenniere
N = Niere
L = Leber
F = Magen, Fundusteil
P = Magen, Pylorusteil
D = Dünndarm
PS = Pankreas
C = Colon
H = Hoden

von histologischen Schnitten möglich.

In der Milz findet sich die Aktivität vor allem in der roten Pulpa, also dem Organteil, in dem die Erythrozyten abgebaut werden, während die Follikel, in denen die Lymphozyten entstehen, deutlich ausgespart sind.

Aus dem Pankreas lassen sich die Langerhans'schen Inseln nicht ausmachen, nur die bindegewebigen Septen sind zu erkennen, weil sie keinen radioaktiven Kohlenstoff enthalten.

In den Nieren ist die Radioaktivität so verteilt, dass die Markzone stärker markiert ist als die Rinde. Umgekehrt verhält sich die Nebenniere. Sie enthält nach 4 Tagen von allen Organen offenbar die höchste Konzentration an radioaktiven Stoffen, die vornehmlich in der Rinde liegen, während das Mark als dunkler Fleck erscheint Abb. 13.

Im Hoden sind die Samenkanälchen frei von Radioaktivität. Die wabige Zeichnung der Struktur ist durch die Aufhellung über dem interstitiellen Gewebe bedingt.

Im Herzmuskel stellt sich die Markierung auf dem Autoradiogramm als relativ spät einsetzender Vorgang dar. Am Anfang ist fast nichts zu erkennen, nach 24 Stunden schon eine deutliche Aufhellung und nach 4 Tagen ist die Konzentration von C-14 im Herzmuskel etwas höher als in der Leber, der Niere oder den Schleimhäuten. Für die Deutung dieses Befundes ist zu berück-

sichtigen, dass ein unmittelbarer Vergleich der Bilder von verschiedenen Tieren, die nach verschiedenen Zeiten getötet wurden, leicht zu Fehlschlüssen führen kann. Wenn die Radioaktivität z.B. aus der Leber schneller ausgeschieden wird als aus dem Herzmuskel, könnte dadurch eine Anreicherung im Herzen vorgetäuscht werden. Jedoch ist nicht auszuschliessen, dass eine in einem anderen Organ entstandene radioaktiv markierte Substanz in den Herzmuskel eingelagert und dort nun langsam umgesetzt wird. Ganz ähnlich wie das Herz verhält sich die Skelettmuskulatur wo in abgeschwächter Form das Gleiche beobachtet wird.

In Abb. 15 - 17 sind Vergrösserungen des Femur zu verschiedenen Zeiten dargestellt. Man sieht im Anfang nur eine Markierung der Randpartien, die wohl der Corticalis zuzuordnen ist (Abb. 15). Das Bild ändert sich aber sehr bald. Schon nach 2o Min. (Abb. 16) ist die Aktivität auch in die Spongiosa gelangt und nahezu gleichmässig auf Rinde und Mark verteilt. Nach 6o Min. hat die C-14-Konzentration in der Corticalis bereits erheblich abgenommen. 4 Tage später (Abb. 17) lässt sich in der Corticalis keine Aktivität mehr nachweisen, während im Mark noch immer reichlich C-14 vorhanden ist. Diese zeitlichen Veränderungen der Verteilung treten auch an den Rippen auf.

In der Haut wandert C-14 im Laufe der 4 Tage von den inneren zu den äusseren Hautschichten.

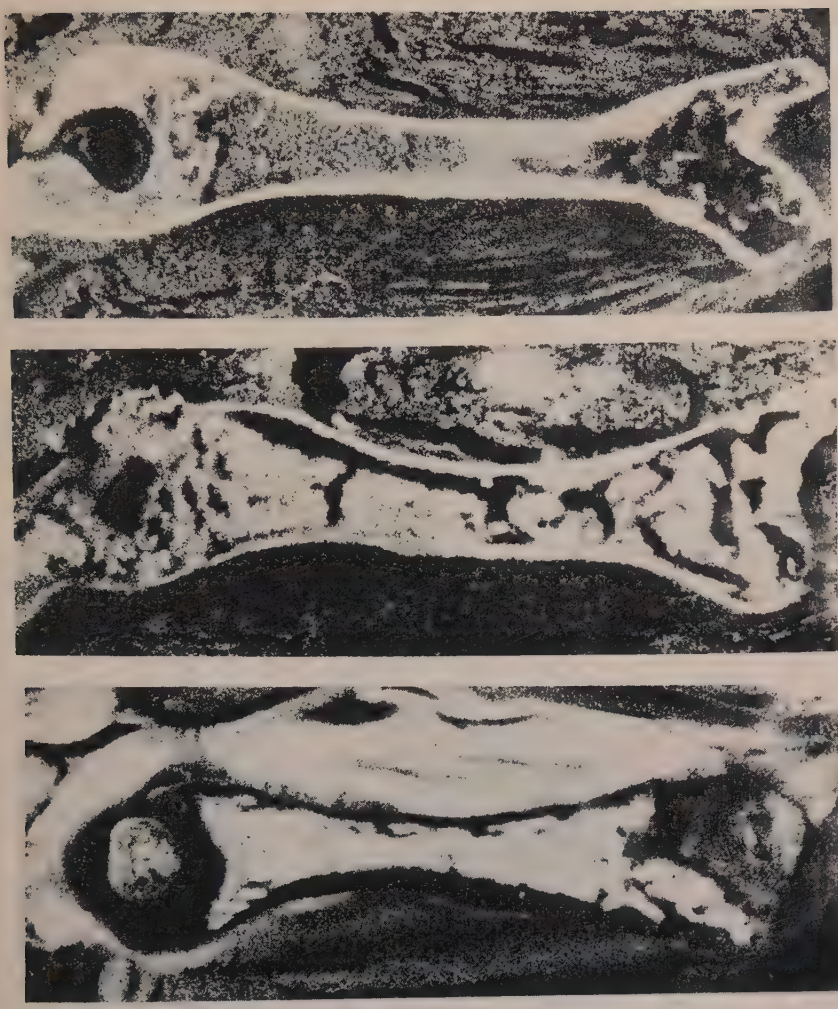

Abb. 15: Femur einer Maus, 5 Min. nach oraler Applikation von 29,17 . 10^6 Tpm = 8,9 mg/kg C-14-Formaldehyd.

Abb. 16: Femur einer Maus, 2o Min. nach oraler Applikation von 58,33 . 10^6 Tpm = 18,o mg/kg C-14-Formaldehyd.

Abb. 17: Femur einer Maus, 4 Tage nach oraler Applikation von 58,33 . 10^6 Tpm = 16,o mg C-14-Formaldehyd.

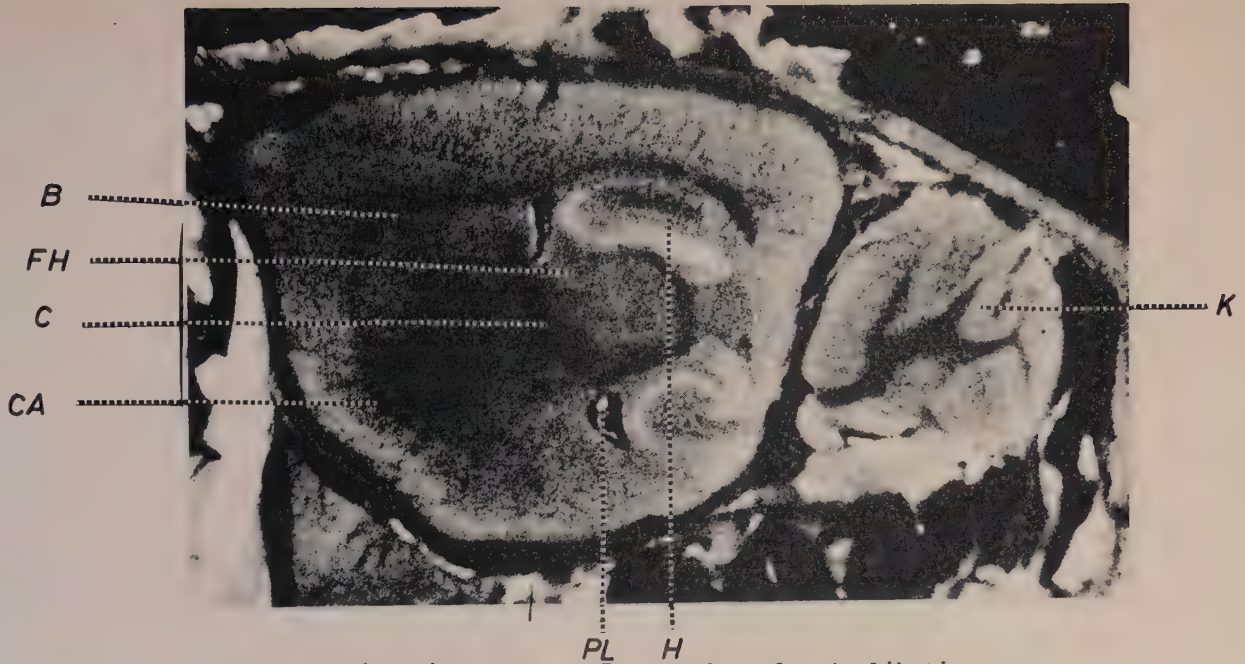

Abb. 18: Gehirn einer Maus, 4 Tage nach oraler Applikation von 58,33 . 10^6 Tpm ≙ 12,6 mg/kg C-14-Formaldehyd.

B = Balken
PL = Plexus chorioides
H = Hippocampus
FH = Fimbria hippocampi
K = Kleinhirn
C = Caps. interna
CA = Vorderer Teil der Commissura anterior

Ins Gehirn (Abb. 18) ist C-14 schon nach 2o Min. eingedrungen und zeichnet nach 4 Stunden z.B. die Grosshirnrinde, die Vierhügelplatte und den Hippocampus gegen die weisse Substanz ab, Balken, Fornix, Commissura anterior und andere Bahnen sind ausgespart. Ähnlich verteilt sich die Radioaktivität im Kleinhirn zwischen der grauen und der weissen Substanz. Auf allen Bildern ist im Hippocampus ein sich deutlich abhebender aufgehellter Saum, also eine Anreicherung in einer ganz bestimmten Zone, zu erkennen. Die in den Ventrikeln sichtbare Anhäufung von C-14 liegt sehr wahrscheinlich im Plexus chorioides. Der Liquor cerebrospinalis enthält offenbar keine Radioaktivität. Auch die Hirnhäute stellen sich nicht dar.

Die vergrösserte Darstellung von einem Auge zeigt interessante Einzelheiten (Abb. 19). Man erkennt, dass die Konjunktiva viel Aktivität enthält. Leider ist die Cornea nicht zu beurteilen, aber die Lederhaut ist zu sehen. Sie zeigt weniger Markierung. Dagegen tritt die Netzhaut als dünner Saum stark hervor. Die darunter liegende Aderhaut ist wieder schwächer dargestellt, was durch die sehr geringe C-14-Konzentration des Blutes gut erklärt werden kann. Obwohl der Glaskörper völlig frei ist von Radioaktivität, zeigt sich am Rande der Linse ein schmaler unscharfer Markierungssaum. Der hinter dem Bulbus liegende keilförmige Körper mit der starken Aufhellung ist die

Harder'sche Drüse oder die intraorbitale Tränendrüse.

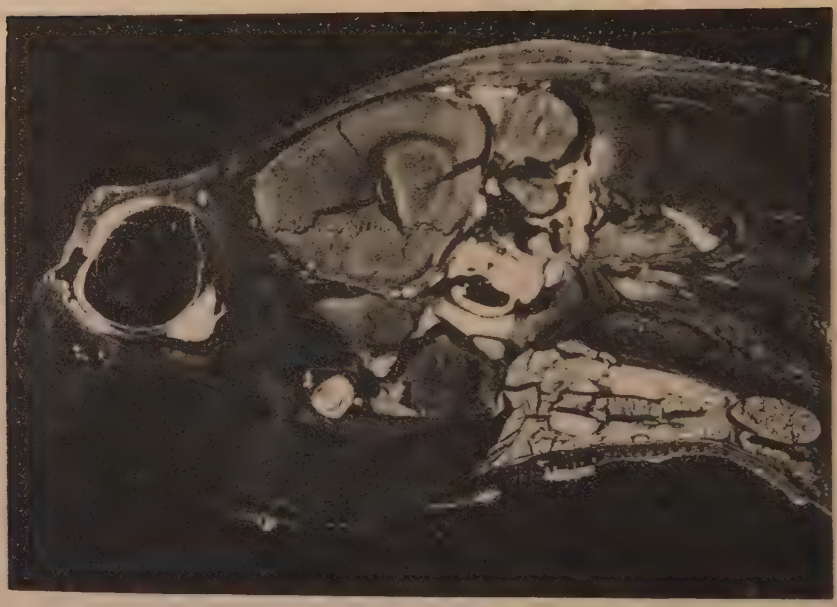

Abb. 19: Kopf einer Ratte, 4 Std. nach oraler Applikation von 3o2,5 . $1o^6$ Tpm = 12,6 mg/kg C-14-Formaldehyd.

B. Messungen der Radioaktivität in Gewebshomogenaten

Mit der autoradiographischen Technik lassen sich die Verteilung von C-14 im Organismus und die Relationen zwischen verschiedenen Organen und Organteilen sehr anschaulich darstellen. Jedoch sind auf diese Weise keine Zahlenwerte zu ermitteln, die aber andererseits die vergleichende Betrachtung in einer leicht fassbaren Form ergänzen würden. Deshalb wurde mit der vorn

erwähnten Methodik die Radioaktivität in den Homogenaten der Organe bestimmt. Zur Erfassung der mit der Zeit auftretenden Veränderungen der Verteilung wären gleichartige Untersuchungen in verschiedenen Abständen nach der Applikation erforderlich gewesen, die aber aus Mangel an der verhältnismässig teuren radioaktiv markierten Substanz nicht vorgenommen werden konnten. Aus diesem Grunde wurde der Zeitpunkt 12 Stunden nach der Verabfolgung gewählt, weil zu dieser Zeit die rasch verlaufende Phase der Elimination weitgehend beendet ist und der gesamte noch vorhandene C-14 in Verbindungen enthalten ist, die zumindest die Eigenschaft gemeinsam besitzen, die eine langsame Ausscheidung bedingt. Die Ergebnisse dieser an der Ratte vorgenommenen Untersuchungen zeigt Abb. 2o.

Bei der Bewertung der Zahlen muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Aktivität, wie aus den autoradiographischen Abbildungen hervorgeht, in den Organen nicht homogen verteilt ist. Zum Beispiel sitzt der radioaktive Kohlenstoff, der im Darm gefunden wurde, fast ausschliesslich in der relativ dünnen Schleimhaut. Die Konzentration ist aber dort wesentlich höher als die im Homogenat der gesamten Darmwand gemessenen Werte angeben. Ähnliches gilt für die Milz, den Hoden, die Haut und das Gehirn.

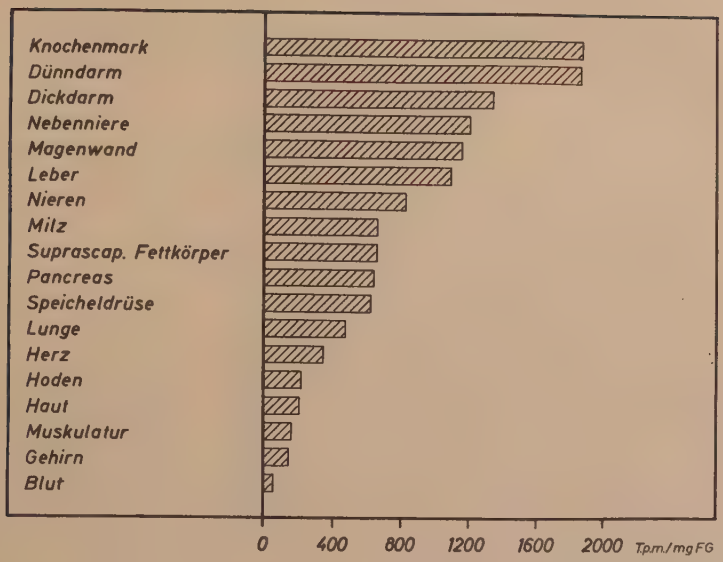

Abb. 2o: Spezifische Aktivität in den Organen und Geweben einer Ratte, 12 Std. nach oraler Applikation von 6,98 mg/kg $H^{14}CHO$.

In Tabelle 6 ist nun aufgeführt, welcher Anteil von der applizierten Radioaktivität nach 12 Stunden noch in den einzelnen Organen enthalten ist. Für das Skelettsystem wurden 1o,9% des Körpergewichtes, für die Haut 18% und für die Muskulatur 45,4% des Körpergewichtes eingesetzt HAGEMANN (19).

Organ	% der verabreichten Aktivität
Knochen	15,61
Muskulatur	5,38
Dünndarm	4,98
Leber	3,12
Haut	2,71
Dickdarm	1,22
Magenwand	o,67
Nieren	o,41
Milz	o,35
Lunge	o,26
Pankreas	o,24
Hoden	o,23
Speicheldrüse	o,23
Blut	o,14
Gehirn	o,12
Herz	o,o9
Suprascapuläre Fettkörper	o,o7
Nebenniere	o,o2
insgesamt	35,85

Tabelle 6: Verteilung des C-14, 12 Std. nach oraler Applikation von 6,98 mg/kg $H^{14}CHO$ bei einer Ratte.

Die Addition ergibt, dass in den Organen und Geweben ca. 36 % des verabfolgten C-14 angetroffen wurde. Die Ratte hatte 41% als $^{14}CO_2$ abgeatmet, 6% mit dem Harn ausgeschieden und 7% befanden sich im Darminhalt und im Kot. Somit sind 9o% wiedergefunden worden.

Die noch fehlenden 1o% werden teilweise durch Verluste zu erklären sein, die bei der Aufarbeitung unvermeidbar sind. Zum Beispiel wurde der Speichel während der 12-stündigen Versuchsdauer nicht gesammelt. Da jedoch die Speicheldrüsen zu den gut markierten Geweben gehören, ist sicher, dass mit ihrem Sekret C-14 abgesondert wird (Abb. 21).

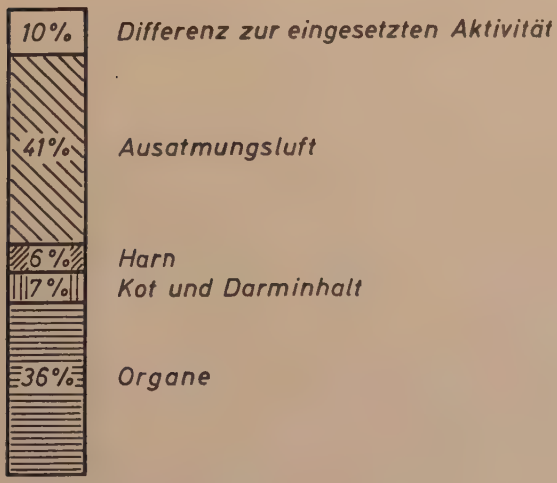

Abb. 21: Verteilung von C-14 in einer Ratte, 12 Std. nach oraler Applikation von 6,98 mg/kg $H^{14}CHO$.

Genauso ist es bei den Tränendrüsen und den Absonderungen der Haut, die ebenfalls nicht mit erfasst sind. Geringfügig mögen die Verluste sein, die durch Vernachlässigung des Inhaltes der serösen Höhlen bedingt ist. Vielleicht befindet sich auch in der Ausatmungsluft der C-14 nicht nur in der Kohlensäure, sondern wird in geringem Umfang auch als Ameisensäure abgeatmet, die mit der Methode nicht erfasst worden wäre.

Somit findet das Defizit von 1o% in der Bilanzrechnung vor allem durch Verluste mit Speichel-, Tränendrüsen- und Hautsekret eine ausreichende Erklärung, zumal in der Rechnung einige Werte enthalten sind, die auf Schätzungen beruhen, so dass eine Abweichung von einigen Prozent durchaus möglich ist.

III. Fraktionierung der radioaktiven Bestandteile von Kot, Harn und Leber

Die vorstehenden Befunde zeigen zwar, dass Formaldehyd aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert wird, sie geben aber keine Auskunft über die Natur der chemischen Verbindungen, in denen der Kohlenstoff des Formaldehyds nach der Verabfolgung vorliegt. Für die ernährungshygienischen Belange ist es vor allem wichtig zu wissen, ob der Kohlenstoff im intermediären Stoffwechsel in den Weg des aktivierten

Formaldehyds oder der aktivierten Ameisensäure einmündet und damit in die physiologischen Körperbestandteile gelangt, oder ob durch Formylierung unnatürliche Produkte entstehen. Einer ersten Orientierung zur Beantwortung dieser Frage dienten die abschliessenden Experimente.

a. Fraktionierung der radioaktiven Kotbestandteile

Formylierungsprodukte könnten schon im Darm entstehen und in nicht resorbierbarer Form im Kot ausgeschieden werden. Von einem Teil derartiger formylierter Stoffe sollte sich der Formaldehyd durch Hydrolyse in HCl abspalten und dann mit H_2O überdestillieren lassen.

Mit Wasser kann die gesamte Radioaktivität aus dem Kot herausgelöst werden. Auf diese Weise wurde aus einer Kotprobe, die in den ersten 4 Std. nach oraler Applikation von radiomarkiertem Formaldehyd entleert worden war, eine C-14 Menge mit 42o ooo Ipm gewonnen. Nach sorgfältiger Vakuumdestillation des Wassers verblieben im Rückstand 262 ooo Ipm oder 64%. Im Kot lagen also 36 % der Radioaktivität in einer chemischen Verbindung vor, die sich mit dem H_2O abdestillieren liess, d.h. als Methanol, Formaldehyd oder als Ameisensäure. Weshalb die Resorption dieser als gut resorbierbar anzusehenden Stoffe unterblieben ist, soll hier

nicht näher betrachtet werden. Nachdem der Destillationsrückstand 3o Min. in $1o^{-2}$n HCl bei 1oo°C hydrolysiert worden war, konnten 77 ooo Ipm mit H_2O überdestilliert werden. Das sind 29 % des im Rückstand verbliebenen C-14 bzw. 18 % des im Kot enthaltenen. Dieser Anteil von rund 2o% der Radioaktivität könnte also in einer formylierten Verbindung vorgelegen haben, die sich durch eine milde Hydrolyse spalten lässt.

Ein 2. Versuch mit Coloninhalt führte zu dem gleichen Resultat. Mit Wasser wurden 71 7oo Ipm extrahiert. Der nach dem Abdestillieren zurückbleibende Rest enthielt 46 5oo Ipm = 65 %. Nach der Hydrolyse liessen sich weitere 21 ooo Ipm überdestillieren, das sind 45 % der Aktivität des Rückstandes und 29 % der Gesamtaktivität des Coloninhaltes.

b. Fraktionierung der radioaktiven Harnbestandteile

Falls im Darm niedermolekulare formylierte Substanzen gebildet und dann auch resorbiert werden, z.B. am Stickstoff formylierte Aminosäuren, sollte erwartet werden, dass diese mit dem Harn ausgeschieden werden. Das gleiche gilt für niedermolekulare Formylierungsprodukte, die erst nach der Resorption von Formaldehyd im Blut entstehen könnten. Aus diesem Grunde wurde untersucht, wieviel radioaktiver Kohlenstoff nach 3o Min. Hydrolyse bei 1oo°C in

$1o^{-2}$n HCl in einer mit Wasserdampf flüchtigen Form vorliegt.

Von 5,578 . $1o^{6}$ Ipm, die in den ersten 12 Std. ausgeschieden waren, gingen 56% nach der Hydrolyse mit dem Wasserdampf in die Vorlage über. Bei der aufsteigenden Papierchromatographie der im Rückstand verbliebenen radioaktiven Stoffe in einem Gemisch von Butanol : Eisessig : Wasser = 8o : 2o : 2o zeigte sich der C-14 in 3 Fraktionen mit den Rf-Werten o,o2, o,o9 und o,53. Eine weitere Analyse zur Identifizierung wurde nicht durchgeführt.

c. Fraktionierung der radioaktiven Bestandteile in der Leber

Zunächst wurde festgestellt, wieviel von der Radioaktivität beim Zusatz von Aceton gefällt wird.

Aus 3 ml wässrigem Leberhomogenat, das 8o9 4oo Ipm enthält, liessen sich durch das 1o-fache Volumen Aceton 566 4oo Ipm = 7o % fällen, die restlichen 3o % befanden sich im Überstand, aus dem beim Abdestillieren des H_2O/Aceton Gemisches nichts ins Destillat übertrat. Die danach zurückbleibenden festen Bestandteile konnten in Wasser gelöst werden. Daraus liessen sich 2o % der radioaktiven Stoffe mit Äther ausschütteln, d.h. von der in der Leber

vorhandenen Aktivität sind 6,5% lipoidlöslich.

Die mit Aceton ausgefällten Stoffe, die 7o% der Radioaktivität enthielten, wurden in 6o ml 6 n HCl aufgenommen und 24 Stunden am Rückflusskühler im Wasserbad bei 1oo°C hydrolysiert. Nach dem Abdestillieren der Salzsäure und nochmaligem Auffüllen und Abdestillieren von 5o ml H_2O erfolgte die Extraktion des Rückstandes mit Chloroform. Das Lösungsmittel enthielt jedoch keine Radioaktivität. Dagegen war anschliessend alles in H_2O löslich. Bei der Destillation gingen 42 ooo Ipm = 7,5 % des C-14 aus dem Rückstand oder 5,2 % des in der Leber insgesamt enthaltenen radioaktiven Kohlenstoffes in die Vorlage über, waren also mit Wasserdampf flüchtig.

Die papierchromatographische Auftrennung der beiden so erhaltenen Leberextrakte sollte zeigen, in wieviel verschiedene Verbindungen der C-14 eingebaut ist. Die wasserlöslichen Rückstände beider Fraktionen, d.h. des Acetonextraktes und der hydrolysierten Fällung wurden aufsteigend in Butanol : Eisessig : Wasser = 8o : 2o : 2o papierchromatographiert.

Zur Ermittlung der Aktivitätsgipfel auf den Papierstreifen diente ein Gerät der Firma Frieseke & Hoepfner. Es handelte sich um ein 4 π-Zählrohr, dessen Zähl-

kammern mit Methan durchströmt wurden. Die Zählausbeute beträgt etwa 15 %.

Mit der ersten Chromatographie war keine gute Trennung zu erzielen. Deshalb mussten die radioaktiven Substanzen mit Wasser eluiert und erneut chromatographiert werden. Als Lösungsmittel wurde nun H_2O : konzentrierter Ammoniak : Isobuttersäure = 33 : 1 : 66 verwendet. Im Chromatogramm des Überstandes der Acetonfällung markierten sich 4 Zonen bei den Rf-Werten: 1) o,24; 2) o,37; 3) o,45; 4) o,66. An der Stelle des 2. Gipfels war mit Ninhydrin eine Rotfärbung zu erkennen.

In der mit Aceton gefällten Fraktion wurden durch die Rechromatographie 2 markierte Flecke mit folgenden Rf-Werten getrennt. 1) o,o28; 2) o,17. Fleck 2 absorbierte ultraviolettes Licht und liess sich mit Ninhydrin anfärben. Eine weitere Analyse zur Identifizierung der radioaktiven Substanzen wurde nicht vorgenommen.

DISKUSSION

Die einleitend gestellte Frage nach der Resorption von Formaldehyd aus dem Magen-Darm-Trakt kann auf Grund der mitgeteilten Untersuchungsergebnisse beantwortet werden. Da mit dem Kot nur 1 - 2 % der als Formaldehyd oral applizierten Menge des radioaktiven Kohlenstoffs ausgeschieden wird, muss er in den Körper aufgenommen worden sein, was durch die autoradiographischen Untersuchungen als richtig erwiesen wurde. Etwa 4o % des zugeführten C-14 erscheinen innerhalb der ersten 4 Stunden als CO_2 in der Ausatmungsluft und nur 1o % im Harn. Das spricht dafür, dass am Anfang ein grosser Teil direkt bis zum CO_2 oxydiert wird und nicht erst nach dem Einbau in andere physiologische Substanzen verbrannt wird. Wenn letzteres der Fall wäre, müsste die Harnausscheidung von C-14 überwiegen und nicht die Exhalation, weil die Stoffe, in die der Kohlenstoff über die Stufe des aktivierten Formiats oder des aktivierten Formaldehyds eingebaut werden kann, vorwiegend zu harnpflichtigen Endprodukten führen. (Abb. 22).

Das nebenstehende Schema zeigt, in welchen Ausscheidungsprodukten der Kohlenstoff des Formaldehyds vorkommen kann und welche Zwischenstufen er dabei durchläuft. Auf der linken Seite steht das CO_2 und die daraus entstehenden Verbindungen und nach rechts führt der Weg

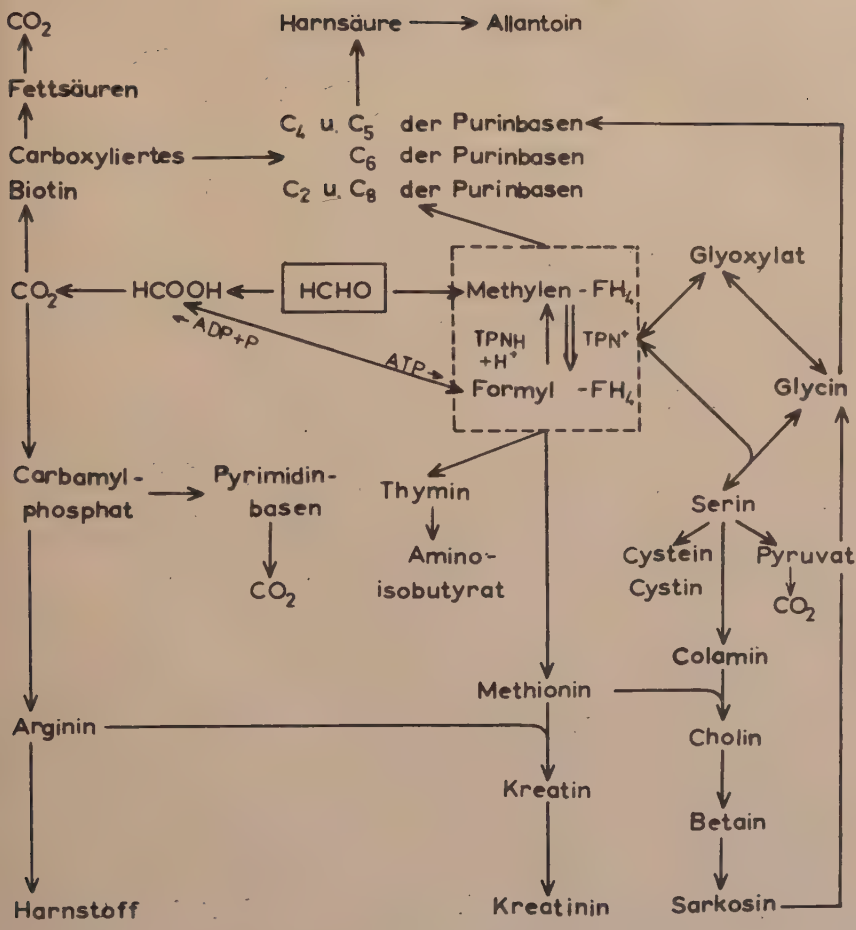

Abb. 22: Stoffwechsel des Formaldehyd.

über die als Tetrahydrofolsäurederivate aktivierten C_1-Körper. Beide Seiten stehen über Ameisensäure und ihre aktivierte Form miteinander in Verbindung. Die Oxydation des Formaldehyds erfordert auf jeden Fall zwei Schritte, von denen der erste zur Ameisensäure führt. Sie kann auf direktem Wege mit Hilfe der peroxydatischen Wirkung der Katalase erfolgen (AEBI (12)) oder über die Stufe des aktivierten Formaldehyds durch eine TPN^+ abhängige Dehydrogenase bewirkt werden. Für die zweite Art der Oxydation ist zunächst die Kondensation von Formaldehyd mit Tetrahydrofolsäure zu N_5, N_{10}-Methylentetrahydrofolsäure, dem aktivierten Formaldehyd notwendig, die im schwach sauren Milieu (pH 6) spontan abläuft. In der Zelle wird sie durch ein aktivierendes Enzym beschleunigt (JAENICKE (13). Andererseits ist aber auch die Aktivierung auf der Stufe des Formiats, d.h. die Bildung von N_{10}-Formyltetrahydrofolsäure aus Formiat und Tetrahydrofolsäure möglich. Diese Reaktion ist von einer gleichzeitigen ATP-Spaltung begleitet und kann unter geeigneten Bedingungen in umgekehrter Richtung verlaufen und damit freie Ameisensäure liefern. Auf welchem Wege die Oxydation des oral zugeführten Formaldehyds zu Ameisensäure und weiter zu dem exhalierten CO_2 im Tierkörper vor sich geht, kann aus den Versuchsresultaten nicht geschlossen werden.

Ebenso ist der Ort, an dem die Umwandlungen stattfinden, nicht zu bestimmen, aber er lässt sich aus den nachfolgend dargestellten Überlegungen vielleicht ableiten.

Das Blut enthält, wie gezeigt wurde, während der gesamten Versuchsdauer sehr wenig radioaktiven Kohlenstoff. Dagegen fanden MALORNY u. RIETBROCK (14) bei der Inkubation von Formaldehyd mit Vollblut grosse Mengen Ameisensäure. In ihren Tierversuchen jedoch war die Ausscheidung von Ameisensäure im Harn nach enteraler Verabfolgung von Formaldehyd nicht erhöht. Erst bei der Verwendung von markiertem Formaldehyd gelang es ihnen, radioaktive Ameisensäure im Urin nachzuweisen. Würde der Formaldehyd als solcher ins Blut gelangen, müsste man wohl eine Formylierung der Plasmaproteine und eine Anlagerung an die Blutzellen und damit für längere Zeit eine höhere Konzentration von C-14 im Blut erwarten. Fände eine sofortige Umwandlung zu Ameisensäure im Blut statt, dann sollte das eine weit stärkere Ausscheidung durch die Nieren zur Folge haben. Aus diesen Gründen ist es wahrscheinlich, dass der Formaldehyd schon im Darmlumen oder beim Durchgang durch die Darmwand in eine andere Form übergeht. Die Oxydation auf die eine oder andere Weise könnte in den Epithelien des Dünndarmes erfolgen. Die peroxydatische Oxydation von Formiat durch Katalase ist

im Dünndarmextrakt von ORO u. RAPPOPORT (15) nachgewiesen worden, und AEBI (12) hat gezeigt, dass Formaldehyd durch Katalase ebenfalls zu CO_2 umgewandelt wird. Die Bildung von aktiviertem Formaldehyd oder von aktiviertem Formiat im Darmgewebe ist bisher zwar nicht direkt experimentell belegt, aber es ist kaum zu bezweifeln, dass die Darmepithelien dazu in der Lage sind, denn sie müssen sich ständig erneuern und dazu ist eine erhebliche synthetische Leistung notwendig, die mit dem Einbau aktivierter C_1-Körper verknüpft sein muss.

Falls die Oxydation in der Darmwand durch die Katalase beschleunigt wird, müsste sie zunächst für den Teil, der exhaliert wird, also ca. 40 % der verabfolgten Menge, direkt bis zum CO_2 fortschreiten. Erfolgt in der Darmwand dagegen die Bildung aktivierter C_1-Körper, dann könnte der weitere Stoffwechsel, d.h. Fortschreiten der Oxydation oder Verwendung als Methyldonator, auch in der Leber stattfinden, wohin der Kohlenstoff als aktivierter Formaldehyd oder als aktiviertes Formiat mit dem Pfortaderblut gelangen und dort vollständig abgefangen würde.

Über den Charakter der chemischen Verbindungen, in denen der Teil des C-14 im Körper enthalten ist, der nicht als CO_2 abgeatmet wird, sind einige Anhaltspunkte durch die Fraktionierungsexperimente gewonnen worden. Dabei kann es sich um physiologische Körperbestand-

teile handeln, die durch den Einbau über die aktivierten C_1-Stufen entstanden sind. Bei subcutaner Injektion von markiertem Formaldehyd fanden LOWY, BROWN u. RACHELE (16) den Kohlenstoff in den Nucleotid-Basen, im Cholin und im Harnstoff wieder. Aus ihren Versuchen geht jedoch nicht hervor, ob das der einzige, ob es der bevorzugte, oder ob es ein weniger bedeutsamer Stoffwechselweg ist. Selbstverständlich können auch unnatürliche Formylierungsprodukte auftreten, die dann allerdings höchst wahrscheinlich schon im Darmlumen gebildet und nach der Resorption ebenfalls zum grössten Teil von der Leber aus dem Pfortaderblut aufgenommen werden. Im Kot und im Darminhalt liegen 3o % des C-14 in einer Form vor, aus der er durch saure Hydrolyse unter milden Bedingungen in einer mit Wasserdampf flüchtigen Verbindung überführt werden konnte, Dafür kommen Schiff'sche Basen oder andere Formylierungsprodukte ähnlicher Stabilität in Betracht (LEVY a. SILBERMAN (17) und FRENCH a. EDSALL (18). Von den in der Leber vorhandenen markierten Substanzen waren nur 5 % nach der Hydrolyse mit Wasserdampf destillierbar. Etwa 6 % der C-14 enthaltenden Leberbestandteile lagen in einer lipoidlöslichen Form vor. Hier kommen Fettsäuren in Frage oder Serin und Cholin als Bausteine von Phosphatiden.

Die papierchromatographische Auftrennung der nicht

flüchtigen Bestandteile des Harnes, der wasserlöslichen Stoffe aus der Leber und des Hydrolysates aus dem mit Aceton gefällten Leberhomogenat zeigte insgesamt 9 verschiedene Verbindungen, von denen sich 2 mit Ninhydrin zu einem rötlichen Farbstoff umsetzten, also Aminosäuren sein könnten. Keine der beiden Substanzen hatte den gleichen Rf-Wert wie Serin, das unter den Aminosäuren am ehesten markiert sein könnte.

Im Harn war etwa die Hälfte aus schwach saurer Lösung mit Wasserdampf flüchtig. Ob es sich dabei um Ameisensäure oder aus Bicarbonat freigesetztes CO_2 handelt, wurde nicht geprüft.

Das Auftreten unnatürlicher Formylierungsprodukte erscheint also nicht ausgeschlossen. Ein Hinweis auf die Entstehung derartiger Stoffe kann auch aus einer ganz andersartigen Beobachtung abgeleitet werden. Das Fell von Ratten und Mäusen, die längere Zeit formaldehyd- oder hexamethylentetraminhaltiges Futter bekommen oder einmalig eine grössere Dosis erhalten, färbt sich gelb. Der Farbstoff verschwindet 3 - 4 Tage nach dem Aussetzen der Zufuhr. Dieser Farbstoff ist vermutlich ein unnatürliches Produkt. Seine Isolierung und chemische Identifizierung muss jedoch noch abgewartet werden.

Die autoradiographischen Beobachtungen gestatten keine

Aussagen über die Verteilung des C-14 innerhalb der Zellen. Darüber können nur autoradiographische Untersuchungen mit histologischer Technik Auskunft geben, die wegen der guten Wasserlöslichkeit der markierten Substanz und vieler ihrer Stoffwechselprodukte schwierig durchzuführen sind.

Ebenso wären weitere Experimente notwendig, um zu klären, in welcher Form sich der markierte Kohlenstoff bevorzugt in der Nebennierenrinde anreichert.

Für die radioaktiven Ablagerungen im Herzmuskel, die nach 4 Tagen stärker hervortreten als in anderen Organen, obwohl das Herz vorher wenig C-14 enthielt, ist zunächst keine Erklärung zu finden. Vielleicht geben sich hier Besonderheiten des Stoffwechsels und des Stoffaustausches mit anderen Organen zu erkennen, die für weitere Studien zugänglich sind.

Eine starke Markierung findet sich generell in allen excretorischen Organen, in der Leber, in der Niere, in den Speicheldrüsen, in den Schleimhäuten und in der Haut. Schleimhautepithelien und Hautepithelien sind andererseits aber auch Gewebe mit einer relativ hohen Zellbildungsrate, in denen naturgemäss viele C_1-Körper als Bausteine benötigt werden. Unter diese Kategorie würde ausserdem noch das Knochenmark fallen und die Hoden. Die starke Anreicherung im suprascapulären Fettgewebe könnte darauf hindeuten, dass der

C-14 über die Stufe des CO_2 in gewissen Mengen zur Synthese von Fettsäuren verbraucht wird. Das wäre in Anbetracht der hohen Ausscheidung als CO_2 eine durchaus plausible Erklärung. Die elektive Verteilung in der Milz, bei der die rote Pulpa wesentlich mehr C-14 enthält, erweckt die Vorstellung, dass die dort abgebauten Erythrocyten den Kohlenstoff mitgebracht haben könnten.

ZUSAMMENFASSUNG

In Untersuchungen an Mäusen und Ratten wurde die enterale Resorption von Formaldehyd nachgewiesen, der mit C-14 radioaktiv markiert war. Im Tierkörper wird ca 40 % des Formaldehyds zu CO_2 oxydiert, die im Laufe der ersten Stunden in der Ausatmungsluft zu finden ist. Während der gleichen Zeit werden im Harn nur 8 % des als Formaldehyd zugeführten C-14 ausgeschieden. Die Elimination über den Darm beträgt 0,5 - 2 %. Die höchsten Konzentrationen in der ausgeatmeten Luft und im Urin treten ca 1 - 1 1/2 Stunden nach der Verabfolgung auf. Die weitere Abgabe der Radioaktivität aus dem Tierkörper erfolgt nach Ablauf der ersten 12 Stunden sehr langsam. Mit Hilfe der Autoradiographie von Ganztierschnitten ließ sich die Verteilung des markierten Kohlenstoffs auf die einzelnen Organe darstellen. Die im Laufe von 4 Tagen auftretenden Veränderungen der C-14-Konzentration in den verschiedenen Geweben werden beschrieben. In den Organhomogenaten und in den Ausscheidungen finden sich 12 Stunden nach der Applikation 90 % der oral gegebenen Radioaktivität. Die im Kot und im Dickdarminhalt enthaltenen, markierten Substanzen sind wasserlöslich. Davon lassen sich ca. 30 % durch milde Hydrolyse in eine mit Wasserdampf flüchtige

Form umwandeln. Von den radioaktiven Verbindungen in der Leber sind 6 % lipoidlöslich, bei der Fällung mit Aceton befinden sich 2/3 im Niederschlag und 5 % lassen sich nach saurer Hydrolyse mit Wasserdampf überdestillieren. Die papierchromatographische Auftrennung ergibt insgesamt 9 markierte Stoffe.

Abschliessend wird an Hand der Versuchsresultate diskutiert in welcher Form der in Formaldehyd eingebaute C-14 resorbiert wird und welchen chemischen Umwandlungen er im Organismus unterliegt.

LITERATUR

1) KAPLAN, W.D.:
Formaldehyde as a Mutagen in Drosophila.
Science 1o8, 43 (1948)

2) AUERBACH, Ch.:
Problems in Chemical Mutagenesis.
Symp. on Quantitative Biol. Vol. XVI.
Genes and Mutations (1951)

3) WATANABE, F. and S. SUGIMOTO:
Study on the Carcinogenity of Aldehyde,
2nd Report. Seven Cases of Transplantable
Sarcomas of Rats Appearing in the Areas
of Repeated Subcutaneous Injections of
Urotropin.
GANN, Vol. 46, 365 (1955)

4) McGUIGAN, H.:
Formaldehyd.
J.Amer.Med.Ass. 62, 984 (1914)

5) WOLF, E.:
Die Physiologie des Formaldehyds.
Diss. München 1949 zit. nach W.Schmidt-Lorenz.

6) SCHMIDT-LORENZ, W.:
Zur Verwendbarkeit von Hexamethylentetramin
und Formaldehyd als Konservierungsmittel.
Z.f. Lebensmitteluntersuchung u. -Forschung
1o8, (1958)

7) SCHASSAN, H.H.:
Neue Erkenntnisse über den Stoffwechsel des
Trimethylaminoxyds unter besonderer Berück-
sichtigung der Ausscheidung von Formaldehyd
und Ameisensäure im Urin von Säugern nach
Verabreichung von Fisch bzw. Trimethylamin-
oxyd.
Diss. Hamburg 1962

8) MALORNY, G. und N. RIETBROCK:
Das Hexaminproblem vom Standpunkt des Mediziners und Toxikologen.
Briefliche Mitteilung

9) ULLBERG, S.:
Studies on the Distribution and Fate of S^{35}-Labelled Benzyl-Penicillin in the Body.
Acta radiol. (Stockholm) Suppl. 118, 1 (1954)

1o) ANTONACOPOULOS, N.:
Vorschläge zur quantitativen Bestimmung des Formaldehyd im Bindegewebe des Fleisches und seiner Zubereitungen.
Diss. München 1957

11) REMMER, H.:
Die Beschleunigung der Evipanoxydation und der Demethylierung von Methylaminoantipyrin durch Barbiturate.
Arch.exp.Path.u.Pharmakol. 237, 296 (1959)

12) AEBI, H.:
Über die Aktivität einiger Fermente des Ein-Kohlenstoff-Fragment-Stoffwechsels in der Leber des Menschen.
Europ.Symp.med.Enzymol., Milano 196o,44-51
Karger (Basel, New York)

13) JAENICKE, L.:
Die Folsäure im Stoffwechsel der Ein-Kohlenstoff-Einheiten.
Angewandte Chemie 13, 449 (1961)

14) MALORNY, G., N. RIETBROCK und M. SCHNEIDER:
Schicksal des resorbierten Formaldehyd.
Arch.exp.Path.u.Pharmakol. 247, 381 (1964)

15) ORO, J. and D.A. RAPPOPORT:
Formate Metabolism by Animal Tissues.
II. The Mechanism of Formate Oxidation.
J.Biol.Chem. 234/III, 1661 (1959)

16) LOWY, B.A., G.B. BROWN and J.R. RACHELE:
A Study of Formaldehyde-C^{14}, D_2 as a
One-Carbon Metabolite in the Rat.
J.Biol.Chem. 22o, 325 (1956)

17) LEVY, M. and D.E. SILBERMAN:
The Reactions of Amino Acids and Imino Acids
with Formaldehyde.
J.Biol.Chem. 118, 723 (1937)

18) FRENCH, D. and J.T. EDSALL:
The Reactions of Formaldehyde with Amino
Acids and Proteins.
Advances in Protein Chemistry Vol. II, 277 (1945)
Academic Press Inc., New York

19) HAGEMANN, E.:
Ratte und Maus.
Walter de Gruyter & Co., Berlin 196o,S. 124

Herrn Prof. Dr. med. H. Kewitz danke ich für die Überlassung des Themas, die Anleitung zur Aufstellung des Arbeitsplanes und zur Abfassung der Arbeit. Für die freundliche Überlassung von Arbeitsplätzen und Geräten bin ich Herrn Prof. Dr. med. H. Herken und Herrn Prof. Kewitz zu Dank verpflichtet. Bei der Durchführung der Experimente und beim Erlernen der Methoden haben mich Herr Prof. Koransky und Herr Dr. Buss durch vielfältigen Rat unterstützt. Auch hierfür bedanke ich mich herzlich.

LEBENSLAUF

Am 9.1o.1939 wurde ich als Sohn von Universitätsprofessor Dr.med. Gustav Kuschinsky und Dr.med. Ingeborg Kuschinsky in Berlin geboren. Von 194o bis 1945 wohnten wir in Prag und von 1945 bis 1946 in Erlangen. Dort wurde ich im Herbst 1945 eingeschult und besuchte ab 1946 die Grundschule in Wiesbaden. Von 1949 bis 1958 war ich auf der Diltheyschule, einem Altsprachlichen Gymnasium, in Wiesbaden. Am 26.2.1958 habe ich die Reifeprüfung bestanden. Anschliessend studierte ich Medizin an den Universitäten in Mainz, Marburg, Basel und Freiburg. Die ärztliche Vorprüfung legte ich 196o in Marburg ab. Am 7.11.1963 bestand ich die Ärztliche Staatsprüfung. Vom 1.12.1963 bis zum 3o.4.1964 war ich Medizinalassistent am Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin. Seit dem Sommersemester 1964 studiere ich an der Universität Tübingen Biochemie.

Fotodruck Frau Elly HUTH Tübingen